

IMMUNFUNKTIONELLE PARAMETER
BEI PATIENTEN MIT HISTIOZYTOSIS X
UND NORMALPROBANDEN

Marieluise Edlmann-Eingartner

Disbui. München

1987



Aus der Medizinischen Klinik III
Klinikum Großhadern
Vorstand: Professor Dr. med. W. Wilmanns

IMMUNFUNKTIONELLE PARAMETER BEI PATIENTEN MIT HISTIOZYTÖSE X
UND NORMALPROBANDEN

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Marieluise Edlmann-Eingartner
aus
Passau
1987



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554818_0061

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. R. Eckstein

Mitberichterstatter: 1. Prof. Dr. med. Dr. h.c. W. Brendel

2. Prof. Dr. med. W. Wilmanns

Dekan: Prof. Dr. med. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 12. 11. 1987

Immunfunktionelle Parameter bei Patienten mit Histiozytose X und bei Normalprobanden

	Seite
1 Einleitung	5
1.1 Die Bedeutung des Lymphozyten für die Immunabwehr des menschlichen Organismus	6
1.1.1 B-Lymphozyten	7
1.1.2 T-Lymphozyten	9
1.1.2.1 T-Helferzellen	10
1.1.2.2 T-Killerzellen	11
1.1.2.3 T-Suppressorzellen	11
1.1.3 Nullzellen	12
1.2 Der Ablauf von Immunreaktionen	13
1.3 Das HLA-System	14
1.4 Ziele der Untersuchung	16
2 Materialien und Methoden	20
2.1 Probanden.....	20
2.1.1 Normalprobandenkollektiv	20
2.1.2 Patienten mit Histiozytose X	20
2.2 Immunfunktionelle Untersuchungen	21
2.2.1 Mitogen- und Antigenstimulation	21
2.2.1.1 Mitogenstimulation	21
2.2.1.2 Antigenstimulation	22
2.2.2 "Suppressorzellassay"	24
2.3 T-Zell-Subfraktionen	27
2.4 Immungenetische Untersuchungen	28
2.4.1 HLA-A, -B, -Cw-Antigene	28
2.4.2 HLA-DR-Antigene	29
2.5 Statistische Analysen	31
2.5.1 T-Test	31
2.5.2 Clusteranalyse	31
2.5.3 Relatives Risiko	33

3	Ergebnisse	35
3.1	Analyse der Ergebnisse im T-Test	35
3.1.1	Mitogen- und Antigenstimulation	35
3.1.1.1	Mitogenstimulation	35
3.1.1.2	Antigenstimulation	35
3.1.2	"Suppressorzellaktivität"	47
3.1.3	T-Zell-Subfraktionen	47
3.2	Clusteranalyse	57
3.2.1	Normalprobandenkollektiv	57
3.2.2	Histiozytose X	83
3.3	Verteilung der HLA-Gene	89
3.3.1	Normalprobanden-Cluster	89
3.3.2	Patienten mit Histiozytose X	90
4	Diskussion der Ergebnisse	97
4.1	Vergleich der therapierten und untherapierten Patienten mit Histiozytose X mit dem Normal- probandenkollektiv im T-Test	97
4.2	Ergebnisse der Clusteranalyse	99
4.3	Ergebnisse der immunogenetischen Untersuchung	106
5	Zusammenfassung	108
6	Literaturverzeichnis	110
7	Danksagung	130
8	Lebenslauf	131

1 Einleitung

Mit dem Begriff Immunität beschrieb man ursprünglich einen von jeder Ansteckung freien Zustand des Organismus. Heute weiß man, daß kein Lebewesen frei von Ansteckung ist. Vielmehr befindet sich jeder Organismus in ständiger Auseinandersetzung mit seiner Umwelt und den in ihr vorhandenen pathologischen Keimen. Als gesund gilt ein Organismus dann, wenn er in dieser Auseinandersetzung die Oberhand behält (52).

Er verfügt dabei über verschiedene Abwehrmechanismen, spezifische und unspezifische, teils zellulärer, teils humoraler Natur.

Unspezifische Abwehrmechanismen humoraler Art sind Komplement, Properdin, Interferon, natürliche Antikörper wie die regulären Isoagglutinine und bakterizide Stoffe wie das Lysozym. Solche zellulärer Art sind Phagozytose, Pinozytose und Bakterizidie durch Granulozyten. (68, 120, 124, 152, 155, 156, 167, 178, 192, 198).

Ihre Funktionsabläufe sind hauptsächlich durch genetische Faktoren bestimmt (1, 75). Das ist der Grund, weshalb zwischen verschiedenen Spezies und Stämmen Unterschiede in der Resistenz gegenüber pathologischen Mikroorganismen bestehen, und diese zwischen Individuen desselben Stammes weniger deutlich ausgeprägt sind (75, 95).

Diese unspezifischen immunologischen Mechanismen finden sich in einfacher Form schon bei den Einzellern, vollentwickelt bei den Würmern, Mollusken und Insekten (152, 155, 168).

Wirbeltiere dagegen sind in der Lage, auf eingedrungene Antigene mit der Synthese spezifischer Antikörper zu reagieren und Transplantate abzustößen. Sie besitzen einen grundsätzlich gleichartig organisierten immunologischen Apparat und die durch ihn gesteuerten spezifischen Immunantworten werden von lymphoiden Zellen mit immunologischem Gedächtnis ausgeführt. Sie können also nach erneutem Antigenkontakt mit einer schnellen und intensiven Immunantwort reagieren. (16, 28, 33, 131, 160, 168).

1.1 Die Bedeutung des Lymphozyten für die Immunabwehr des menschlichen Organismus

Die Gesamtlymphozytenmasse des menschlichen Organismus beträgt etwa 300 g, davon befinden sich 70 % in lymphatischen Organen, 10 % im Knochenmark, der Hauptbildungsstätte, und 10 - 20 % in anderen Geweben. Im peripheren Blut des Erwachsenen sind normalerweise 25-40 % der zirkulierenden weißen Blutkörperchen Lymphozyten, pro Mikroliter peripheren Blutes finden sich also 1000 bis 3600. Die Blutlymphozyten machen etwa nur 4 % der im Organismus vorhandenen Lymphozyten aus; dennoch sind sie für die Diagnostik von großer Bedeutung (11, 55).

Die größte Gruppe unter ihnen bilden die kleinen Lymphozyten mit einem Zelldurchmesser von etwa 10 μm . In der panoptischen Färbung nach Pappenheim (127) erscheint ihr Plasma mittelblau und umgibt als schmaler Saum einen runden Kern, der tief dunkelblau gefärbt und scharf begrenzt ist. Daneben finden sich im Blutaussstrich größere Lymphozyten mit einem Durchmesser von 10-25 μm und ebenfalls mittelblauem Zytoplasma. Ihr Kern ist meist bohnenförmig eingebuchtet. 10-20 % der zirkulierenden Lymphozyten, meist große Zellen, weisen eine spärliche, violette oder rötliche Granulation auf. Bei Infekten und anderen Reizzuständen nimmt die Zahl dieser granulierten Zellen zu. Außerdem finden sich im peripheren Blut stets auch einige atypische lymphatische Zellen mit einer mehr eckigen Kernform, einem meist sehr hellen Zytoplasma und oft rötlichvioletten Granula (11). Ähnlich den großen, granulierten Lymphozyten sind diese atypischen "Lymphoidzellen" bei Infekten vermehrt und werden häufig in der DNS-Synthesephase angetroffen (197).

Elektronenoptisch zeigt der Lymphozytenkern eine doppelt konturierte Kernmembran. Das Kernchromatin weist amorph angeordnete, massive Granula auf. Das Zytoplasma nimmt mit seinen Organellen im Verlauf der Zellreifung an Umfang ab. Wenige, große Mitochondrien liegen vorzugsweise in der Golgizone, während sich

dicht gepackte Ribosomen gleichmäßig über das ganze Zytoplasma verteilen (18,54). Nur 3 % der Blutlymphozyten besitzen ein spärlich ausgeprägtes Ergastoplasma (89).

Die Lebensdauer von Lymphozyten ist unterschiedlich. Es finden sich kurzlebige, kleine und große Lymphozyten mit einer Lebensdauer von 1-12 Tagen, langlebige kleine Lymphozyten mit einer durchschnittlichen Lebensdauer von 500 Tagen und ebenfalls vor allem kleine Lymphozyten, die Jahrzehnte überleben. Rund 90 % der Blutlymphozyten sind langlebige Zellen (11, 55, 171).

Seit der ersten suffizienten Beschreibung des Lymphozyten durch Virchow (182, 183, 184) konnten lymphatische Zellen bis in die späten 50er Jahre unseres Jahrhunderts nur aufgrund morphologischer Kriterien beurteilt werden. Später wurde die Beteiligung der Lymphozyten an Immunantwortmechanismen wahrscheinlich gemacht (74). In weiteren Studien stellte man eine Vielzahl von Funktionen fest, was schließlich zur heute gültigen Einteilung der Lymphozyten in zwei große Gruppen, die thymusgeprägten T-Lymphozyten und die im Bursaäquivalent geprägten B-Lymphozyten, führte. Diese unterscheiden sich lichtmikroskopisch nicht, nehmen aber aufgrund ihrer unterschiedlichen Prägung verschiedene Aufgaben im Rahmen der spezifischen Immunabwehr wahr (37, 71, 77, 91, 106).

1.1.1 B-Lymphozyten

Der Anteil der B-Lymphozyten an der Gesamtlymphozytenzahl beträgt 22-36 %. Die an der Oberfläche der B-Zellen gebundenen Immunglobuline sind Membranbestandteile (11, 88, 141). Zwei Drittel der B-Lymphozyten tragen Immunglobuline vom IgM-Typ auf der Zelloberfläche, wobei das IgM-Molekül möglicherweise der Rezeptor für die Antigenbindung ist. Sie dürften eine relativ unspezifische B-Zellfraktion repräsentieren, aus der nach antigenem Stimulus Zellen hervorgehen, die andere Immunklassen produzieren (76, 194). Auf den meisten B-Lymphozyten finden sich auch Immunglobuline der IgD-Klasse, die im Serum nur in sehr niedriger



Konzentration vorkommen (64). Nach den Arbeiten verschiedener Autoren, scheinen diese IgD-Moleküle die Antigenrezeptoren der B-Lymphozyten zu sein (128, 151, 185, 186).

Außerdem verfügen B-Zellen auf ihrer Oberfläche über Fc- und Komplementrezeptoren (11).

Im lymphatischen System kommen B-Lymphozyten vor allem in den Lymphfollikeln und den peripheren Zonen der weißen Milzpulpa, in den Rindenfollikeln und im Mark der Lymphknoten, sowie in den Follikeln der Peyerschen Plaques vor. Diese Regionen werden als thymusunabhängig oder B-Regionen bezeichnet (73, 130).

Die Lebensdauer von B-Lymphozyten ist meist kurz. Nur in den äußeren kortikalen Lymphknotenregionen gibt es auch langlebige B-Zellpopulationen. B-Zellen, die ins periphere Blut übergetreten sind, rezirkulieren meist nicht mehr ins lymphatische System (11, 171).

Durch Kontakt mit spezifischen Antigenen proliferieren B-Zellen in vivo zu großen Blasten, von denen sich einige zu Plasmazellen weiterentwickeln. Diese sezernieren spezifische Antikörper, welche in die Blutbahn abgegeben werden und deshalb von einem auf ein anderes Individuum übertragen werden können, wie schon Emil von Behring zeigen konnte (13, 14).

Es wird angenommen, daß B-Zellen auch am Antigentransport beteiligt sind, indem sie mit Hilfe ihrer Fc-Rezeptoren Antigen-Antikörper-Komplement-Komplexe binden.

Die B-Lymphozyten sind also die Träger der spezifischen humoralen Immunantwort (11, 106).

1.1.2 T-Lymphozyten

Neben dieser, innerhalb kurzer Zeit erfolgender, spezifischen humoralen Immunantwort gibt es ein weiteres, ebenfalls spezifisches, Immunsystem auf zellulärer Ebene, die Immunreaktion vom verzögerten Typ. Prototyp ist die Tuberkulinreaktion der Haut, nach intrakutaner Applikation von Alttuberkulin. Sie beginnt Stunden nach Antigenkontakt und erreicht ihren Höhepunkt nach 18 - 48 Stunden. Träger dieser Immunreaktion sind thymusgeprägte Lymphozyten, wie in Tierversuchen dargestellt werden konnte (11, 29, 66, 90, 95, 187, 189).

Träger dieser Immunreaktion, die T-Lymphozyten, wandern in das periphere lymphatische Gewebe ein und werden von dort aus in den Organismus entlassen (125). Die T-Zell-Regionen des lymphatischen Gewebes finden sich in den periarteriolen Gebieten der Milz, den parakortikalen Regionen der Lymphknoten und allen interfollikulären Regionen der lymphatischen Organe (73, 130).

Lichtmikroskopisch unterscheiden sich B- und T-Lymphozyten nicht. Im Elektronenmikroskop wirken B-Zellen durch ihre zahlreichen Mikrovilli stachelig, T-Zellen besitzen eine relativ glatte Oberfläche mit nur kleinen Vorstülpungen der Membran (105, 140).

Die Fähigkeit wahrscheinlich aller T-Zellen, mit Schaferythrozyten Rosettenformationen zu bilden, ist durch ihre Membraneigenschaft bedingt, und kein Ausdruck einer immunologischen Reaktion (57). Der Anteil der rosettenbildenden T-Zellen an den Lymphozyten im peripheren menschlichen Blut beträgt 37 - 74 % (11).

T-Zellen bilden den wesentlichen Teil des rezirkulierenden Pools der kleinen Lymphozyten und sind in der Regel langlebige Zellen. Während ihres mehrjährigen Lebens wandern sie wiederholt über Blut- und Lymphbahnen hin und her, wobei ihre entscheidende Aufgabe in der Überwachung von Fremdanthigenen liegen dürfte (11, 171).

Auf wirksamen Reiz wandeln sie sich in blastäre Zellen um, die eine Reihe von Wirkstoffen mit chemotaktischer, zytotoxischer und mitogener Aktivität freisetzen, die Lymphokine (196). Diese lösen wohl die klassische Immunreaktion vom verzögerten Typ aus, bei der die T-Zellen selbst in zytolytische Zell-zu-Zell-Interaktionen eintreten, wie beispielsweise bei der Transplantatabstoßung oder der Graft-versus-host-Reaktion (11).

Bei der Differenzierung der T-Lymphozyten erfolgt eine Bildung von T-Zell-Subpopulationen, Untergruppen, die verschiedene Aufgaben bei der zellulären Immunantwort übernehmen. Auf antigenen Reiz, meist durch Antigenpräsentation der Makrophagen, entstehen T-Lymphoblasten, aus denen langlebige T-memory-Zellen hervorgehen, die Informationen über Oberflächenmarker der spezifischen Antigene speichern. Bei erneutem Antigenkontakt kann diese Information kurzfristig an die ebenfalls auf den spezifischen Antigenkontakt hin entstandenen Subpopulationen der T-Effektor-Zellen durch Lymphokine übermittelt und so eine schnelle spezifische Immunreaktion in Gang gebracht werden (5, 12, 26, 143, 159, 166, 172).

1.1.2.1 T-Helferzellen

T-Helferzellen spielen eine große Rolle bei der Aktivierung und Regulation der Immunantwort. Sie entstehen durch Differenzierung der immunkompetenten T-Zellen und werden auf Antigenkontakt spezifisch aktiviert. Dieser Vorgang kann durch T-Suppressorzellen antagonisiert werden, wobei möglicherweise Prostaglandine und durch Prostaglandine induzierte T-Suppressorfaktoren als Mediatoren eine wichtige Rolle spielen (191).

Aktivierte T-Helferzellen geben Lymphokine ab, die Makrophagen anlocken und aktivieren, und eine Proliferation und klonale Expansion immunkompetenter B-Zellen und somit die Produktion spezifischer Antikörper durch Plasmazellen induzieren. Es gibt aber auch thymusunabhängige Antigene, die ohne Mitwirkung von Helfer-

zellen eine spezifische humorale Immunantwort der B-Zellen auslösen (69, 139, 173).

T-Helferzellen sezernieren auch Interleukin 2, das zur Differenzierung antigensensibilisierter T-Zellen zu zytotoxischen T-Killerzellen beiträgt (170).

1.1.2.2 T-Killerzellen

T-Killerzellen vernichten als zytotoxische T-Zellen die Zielzellen bzw. Antigene mittels verschiedener Oberflächenrezeptoren. Dies setzt eine Übereinstimmung der Killerzelle mit den Epitopen des Antigens und den Histokompatibilitätsantigenen von Killerzelle und Zielzelle voraus. Das ist beispielsweise bei der Vernichtung von durch Viren befallenen, körpereigenen Zellen der Fall (12).

Der Angriff der zytotoxischen T-Zelle kann aber auch durch spezifische Antikörper vermittelt werden (112). Die endgültige Vernichtung der Zielzelle mit Hilfe von Makrophagen, die von angelagerten T-Zellen über Lymphokine angelockt und aktiviert werden, ist sehr wahrscheinlich auch eine Leistung der T-Killerzellen (101, 174).

1.1.2.3 T-Suppressorzellen

T-Suppressorzellen tragen wie die T-Killerzellen Histaminrezeptoren, die den Helferzellen fehlen (138, 150, 163). Suppressorzellaktivität kann in vivo und vitro erfaßt werden und die Antikörperproduktion der B-Lymphozyten, die Mitogenantwort, die Graft-versus-host-reaction und die gemischte Lymphozytenkultur beeinflussen (42, 58, 70, 81, 86, 132, 147).

Gewisse Anhaltspunkte sprechen dafür, daß Suppressorzellen über Lymphokine die anderen B-Zell-Subpopulationen, die B-Zellen und auch die Makrophagen kontrollieren und damit eine angemessene Immunreaktion erst ermöglichen (52). Die Suppressorzellen in den

Feyerschen Plaques des Dünndarms scheinen dabei eine wichtige Rolle bei Ausbildung und Aufrechterhaltung der Immuntoleranz gegenüber zahlreichen Nahrungsmitteln zu spielen (107).

1.1.3 Nullzellen

Bei der Doppelmarkierung von Lymphozyten in T- und B-Zellen zeigen rund 15 % der Lymphozyten keine Markierung. Diese Zellen werden als Nullzellen bezeichnet. Sie gehören ebenfalls zu den zellulären Elementen der Immunabwehr. Es handelt sich dabei um die nicht spezifischen natural killer oder NK-Zellen und die killer- oder K-Zellen, die man von den oben besprochenen T-Killerzellen unterscheidet (11, 79).

K-Zellen tragen Fc-Rezeptoren auf der Zelloberfläche, über die die Erkennung der für die Zytolyse notwendigen Antikörper-Zielzellkomplexe erfolgt. NK-Zellen sind in der Lage, die Zytolyse der Zielzelle direkt, ohne Vermittlung von Antikörpern, in Angriff zu nehmen, und verfügen somit über Makrophageneigenschaften (117, 175).

Während also die K-Zelle für die Erfüllung ihrer Aufgabe auf die Mitwirkung der antikörperproduzierenden B-Lymphozyten bzw. Plasmazellen angewiesen ist, wird die NK-Zelle unspezifisch aktiviert und vernichtet, ähnlich der T-Killerzelle, die als fremd erkannte Zielzelle über eine direkte zytotoxische Reaktion. Im Gegensatz dazu ist die T-Killerzelle streng antigenspezifisch und von einem immunologischen Gedächtnis, der T-memory-Zelle geprägt. Die durch NK- und K-Zellen vermittelte Immunität scheint vor allem gegen Tumorzellen gerichtet zu sein (84, 134, 136).

1.2 Der Ablauf von Immunreaktionen

Die Leistung des Immunsystems beruht letztlich auf einem fein abgestimmten Zusammenspiel seiner verschiedenen Komponenten. Antigenkontakt mit immunologischen Strukturen erfolgt vorzugsweise in den Follikeln der Schleimhäute, den Tonsillen, den Peyerschen Plaques, den Lymphknoten, der Milz und im retikuloendothelialen oder Monozyten-Makrophagen-System der Leber. Die eingedrungenen Fremdzellen werden unspezifisch durch humorale Faktoren wie Komplement, Properdin und Lysozym geschädigt, zum Teil auch zerstört, und so für den Kontakt mit den zellulären Komponenten des Immunsystems vorbereitet. Spaltprodukte bestimmter Komplementfaktoren scheinen zudem einen chemotaktischen Reiz auf Granulozyten auszuüben, die Degranulation von Basophilen und Mastzellen sowie die Ausschüttung lysosomaler Granulozytenenzyme zu fördern und die Phagozytosefähigkeit der Makrophagen zu steigern (1, 66, 90, 95, 124, 156, 160, 167, 192).

Dabei können die unspezifischen humoralen Faktoren Mikroorganismen so vorschädigen, daß sogar ein direkter Kontakt ihrer antigenen Strukturen mit Lymphozyten erfolgen kann. Meist wird aber dieser Kontakt über die unspezifischen zellulären Komponenten des Immunsystems, die Granulozyten oder Mikrophagen und die Makrophagen vermittelt. Beide können durch humorale Faktoren eine Aktivitätssteigerung erfahren. Sie bereiten durch Phagozytose und dadurch erfolgende Zerstörung der Fremdzellen deren antigene Struktur auf und präsentieren sie den Lymphozyten in der für ihren Erkennungsmechanismus geeigneten Form (11, 66, 120, 152, 155, 160, 178, 198).

Die durch antigene Strukturen aktivierten Lymphozyten setzen die sogenannten Lymphokine frei. Diese locken durch chemotaktischen Reiz weitere Makrophagen und Granulozyten zum Ort des Antigenkontakts, aktivieren sie und halten sie fest, wodurch die Phagozytoseaktivität und somit die Antigenpräsentation an die Lymphozyten vermehrt wird. Ebenso werden weitere Lymphozyten angelockt, wo-

durch wiederum die Zahl der antigenkontaktierenden und antigenaktivierten Lymphozyten zunimmt (11, 35, 38, 66, 120, 149, 160, 196).

1.3 Das HLA-System

Der Mensch besitzt, wie alle Wirbeltiere, Histokompatibilitäts-gene, die die Fähigkeit zur akuten Transplantatabstoßung kodieren. Sie liegen als Haupthistokompatibilitätskomplex kompakt auf dem kurzen Arm des Chromosoms Nr.6 (62). Auf diesem Arm liegt je ein HLA-A, HLA-B, HLA-Cw-Locus, so daß in einer Zelle mit diploidem Chromosomensatz je 2 dieser Loci vorhanden sind. Die HLA-Loci jedes Chromosoms bilden einen Haplotyp und werden grundsätzlich gemeinsam vererbt. Es existieren mehrere Allele für jeden Locus, die mit Zahlen benannt werden, z.B. HLA-A1, HLA-A2, HLA-B5. Ein Individuum kann auf beiden Chromosomen Nr.6 das gleiche Allel besitzen, also homozygot, oder 2 verschiedene Allele, also heterozygot sein.

Die Genprodukte der einzelnen Allele sind Glykoproteine mit einem Molekulargewicht von circa 45 000. In Verbindung mit dem Beta-2-Mikroglubulin, Molekulargewicht etwa 12 000, sind sie auf der Oberfläche fast aller Körperzellen außer Erythrozyten und Thrombozyten, sowie in haploider Expression auch auf Spermien vorhanden (79, 118).

HLA-Antiseren haben nicht nur eine agglutinierende, sondern auch eine zytotoxische Wirkung, die Voraussetzung für die lymphozytotoxischen Mikromethoden zur Bestimmung der HLA-Antigene (96, 176).

Die Genprodukte der A-, B- und Cw-Gene haben zahlreiche Gemeinsamkeiten und werden daher unter dem Oberbegriff "Klasse-I-Antigene" zusammengefaßt (15, 98). Sie definieren wahrscheinlich die "selbst"-Eigenschaften der Zellen, eine Fähigkeit von großer Bedeutung, weil das Immunsystem nur dann Strukturen als fremd erkennen kann, wenn vorher festgelegt ist, was körpereigen ist

(12, 34). T-Killerzellen können virusinfizierte, "fremd" gewordene Zellen nur zerstören, wenn sie dieselben Klasse-I-Antigene wie die Zielzelle tragen, ein Phänomen, das als HLA-Restriktion der Immunantwort bezeichnet wird (41, 111, 119). Dabei scheinen bestimmte A-, B- und Cw-Antigene anderen überlegen: Virusinfizierte Zellen des Phänotyps B7 werden von analogen Killerzellen besonders gut lysiert, während HLA-A9 tragende Zellen von den adäquaten Killerzellen nur unvollkommen attackiert werden (111).

Diesem HLA-Locus eng gekoppelt befindet sich der sogenannte MLC- oder HLA-D-Locus, ein weiterer Bestandteil des Haupthistokompatibilitätskomplexes, der die MLC-Eigenschaften der Lymphozyten kodiert (2, 113, 199):

Mischt man Lymphozytensuspensionen zweier unverwandter Probanden und züchtet das Zellgemisch in der Gewebekultur, so gehen diese Lymphozyten aus dem Ruhezustand in teilungsfähige Blasten über. Der Mitose geht eine DNS-Reduplikation voraus, und so kann man die Lymphozytenstimulation in dieser gemischten Lymphozytenkultur über den Einbau radioaktiver DNS-Vorstufen (³H-Thymidin) quantitativ messen (7, 8, 85).

In der Regel stimulieren sich Lymphozyten HLA-identischer Geschwister in der MLC nicht, wogegen Stimulationen zwischen Lymphozyten HLA-identischer unverwandter keine Seltenheit sind (97, 114, 115, 158). Es konnte nachgewiesen werden, daß sich in Ausnahmefällen Lymphozyten HLA-identischer, nicht aber die HLA-differenten Geschwister in der MLC stimulierten. Diese Ausnahmefälle konnten auf crossig-over Ereignisse zurückgeführt werden, und somit stand fest, daß die MLC-Eigenschaften durch einen eigenen Locus kodiert werden und nicht, wie zunächst angenommen, durch die klassischen HLA-Gene.

Möglicherweise ebenfalls vom HLA-D-Locus, eventuell aber auch von einem ihm eng gekoppelten, aber eigenen HLA-DR-Locus werden die sogenannten HLA-DR-Antigene kodiert, Glykoproteine mit einem Molekulargewicht von 62 000, die sich biochemisch von den klassi-

schen HLA-Gene unterscheiden und ihnen deshalb als Klasse-II-Antigene gegenübergestellt werden (169,193). Diese Antigene finden sich nur auf B-Lymphozyten, Monozyten und Makrophagen, Epithelialzellen und Langerhansschen Zellen. Sie sind wahrscheinlich Rezeptormoleküle für Fremdanigene und vermitteln bestimmte Immunzellkooperationen. Möglicherweise liegt ihre wichtigste Aufgabe in der Steuerung der Antikörpersynthese, die im wesentlichen in Plasmazellen erfolgt, deren Vorstufen die B-Lymphozyten ja sind (162).

Bevor die Plasmazellen Antikörper produzieren, sind vielfache Interaktionen zwischen den verschiedenen zellulären Elementen des Immunsystems erforderlich. Zunächst nehmen die Makrophagen das eingedrungene Fremdanigen auf und präsentieren es, möglicherweise mit Hilfe ihrer Klasse-II-Oberflächenantigene den T-Helferzellen. Dadurch werden diese stimuliert und aktivieren B-Zellklone, die einen dem Antigen entsprechenden Rezeptor tragen. Gleichzeitig werden B-Suppressorzellen angeregt, die die in Gang gekommene Antikörperausschüttung wieder stoppen. Diese Immunzellkooperationen finden nur zwischen Lymphozyten mit wenigstens einem identischen HLA-D-Komplex Antigen statt, ein Phänomen, das mit dem Begriff "Restriktion der Immunantwort" bezeichnet wird. Somit entspricht der HLA-D/DR-Locus in etwa der sogenannten I-Region auf dem Haupthistokompatibilitätskomplex der Maus (16, 118, 188), ein Genort, der eine Immunantwort gegen bestimmte komplementäre Antigene erst ermöglicht (200).

1.4 Ziele der Untersuchung

Störungen derart komplexer Funktionsabläufe der Immunantwort könnten Ausgangspunkt für unterschiedliche Krankheiten sein. Es konnte zum Beispiel gezeigt werden, daß zahlreiche Autoaggressionskrankheiten, wie etwa der Lupus erythemathodes oder die chronisch aggressive Hepatitis mit niedriger Suppressorzellaktivität einhergehen (19, 87).

Bei der Myokarditis und dilatativen Kardiomyopathie wurde ebenfalls eine erniedrigte Suppressorzellaktivität beschrieben (44, 45, 46, 47, 61).

Auch andere, in vitro meßbare, immunfunktionelle Parameter sind bei verschiedenen Erkrankungen verändert. Lymphozyten von Patienten mit chronisch lymphatischer Leukämie und von Patienten mit Morbus Hodgkin zeigen eine verminderte Proliferationsbereitschaft auf das Mitogen Phytohämagglutinin, die Lymphozyten der Patienten mit Morbus Hodgkin auch auf andere Mitogene (20, 21, 24, 39, 43, 62, 83, 153).

Bei Patienten mit chronischer Polyarthrititis ist ein von der Norm abweichendes lymphozytäres Reaktionsverhalten auf mitogenen Reiz beschrieben worden (30). Beim Mammakarzinom wurden Zusammenhänge zwischen mitogener Lymphozytenstimulierbarkeit, Prognose und Therapieerfolg beobachtet (93).

Die Entdeckung monoklonaler Antikörper zur Differenzierung der verschiedenen T-Zellsubpopulationen (100, 145, 146) führte zur Beschreibung von der Norm abweichender T-Zellkompartimentzusammensetzungen bei verschiedenen Erkrankungen, deren Ursache eine Störung des Immunsystems sein könnte (6, 48, 142).

Der Histiozytose X schließlich liegt, wie dem Morbus Abt-Letterer-Siwe und der Hand-Schüller-Christian-Krankheit, die sich von ihr im klinischen Verlauf wesentlich unterscheiden, eine proliferative Störung des Monozyten-Makrophagen-Systems zugrunde (4, 78, 104). Da es in der Literatur zahlreiche Hinweise darauf gibt, daß diese Störung des Monozyten-Makrophagen-Systems durch eine gestörte Lymphozytenfunktion mit einer möglicherweise unzureichenden lymphozytären Kontrolle der Makrophagen bedingt sein könnte (32, 51, 92, 104, 123), und nach Behebung solcher lymphozytärer Funktionsstörungen Vollremissionen der Erkrankung auftreten (123), ist es ein Anliegen der vorliegenden Studie, speziell die Lymphozytenfunktion dieser Patienten mit Histiozytose X zu untersuchen.

Die Histiozytose X, im Erwachsenenalter auch als eosinophiles Granulom bezeichnet, wurde zuerst als Knochenerkrankung beschrieben; heute dagegen gilt die Lunge als Hauptmanifestationsort, und es zeigen nur 10 % der Patienten einen Knochenbefall. Selten sind Hautmanifestationen und ein Diabetes insipidus. Der Altersgipfel liegt bei 20 - 30 Jahren (10, 32, 63, 78, 92, 104, 129).

Die Krankheit verläuft meist chronisch mit zunehmender Verschlechterung der Lungenfunktion, wobei sowohl Spontanremissionen als auch erneute Exazerbationen vorkommen. Die Histiozytose X unterscheidet sich somit von anderen Systemerkrankungen, die unbehandelt meist rasch progredient verlaufen (104). Dazu sind die histologischen Bilder echter Neoplasien meist relativ homogen, während die Histologie von Histiozytose-X-Herden ein buntes Bild bietet (56, 144).

Klinisch und pathophysiologisch bestehen zahlreiche Analogien mit autoaggressiven Prozessen: Beispielsweise finden sich bei Patienten mit Histiozytose X häufig Antikörper gegen autologe Erythrozyten, und in verschiedenen Studien wird eine erniedrigte Suppressorzellaktivität beschrieben, was für viele autoaggressive Prozesse charakteristisch ist (65, 123). Diese Befunde legen die Hypothese nahe, der Histiozytose X könne eine Immundefunktionsstörung zugrunde liegen (27, 72).

Das herkömmliche therapeutische Verfahren bei der Histiozytose X entspricht im wesentlichen der Therapie maligner Erkrankungen (109).

Nun wurde in jüngster Zeit berichtet, daß es gelungen ist, bei der Histiozytose X bestehende immunfunktioneller Aberrationen durch intramuskuläre Injektion von Kälberthymusextrakt zu beheben, und damit auch klinische Remissionen zu erzielen (123).

Vor dem Hintergrund solcher Befunde stellten wir uns folgende Fragen:

1. Zeigt das Krankheitsbild der Histiocyotose X systematische immunfunktionelle Aberrationen in vitro?
2. Können derartige Befunde zum besseren Verständnis der Pathophysiologie dieser Krankheit beitragen?
3. Läßt sich unter Gesunden ein Risikokollektiv für diese Erkrankung bilden?
4. Bietet die Therapie mit Kälberthymusextrakt eine echte Alternative zur bisher üblichen Therapie?

Angeichts der Ergebnisse stellten wir uns zusätzlich noch die Frage:

5. Lassen sich Hinweise auf eine Steuerung der unterschiedlichen Immunfunktion durch Gene des Haupthistokompatibilitätskomplexes finden?

2 Materialien und Methoden

2.1 Probanden

2.1.1 Normalprobandenkollektiv

Das Normalprobandenkollektiv umfaßte 88 gesunde Probanden, 32 Männer und 56 Frauen im Alter von 17 bis 57 Jahren, Mittelwert 30,7 Jahre, Standardabweichung 9,4 Jahre.

Keiner der Probanden hatte Tage bis Wochen vor der Untersuchung einen viralen oder bakteriellen Infekt durchgemacht.

Anamnestisch war bei allen Probanden Kontakt mit Streptokokken erfolgt, ebenso eine Infektion mit Masernviren in der Kindheit: alle Probanden waren der ehemals obligatorischen Pockenerst- und Wiederimpfung unterworfen worden, wobei die Impfungen jeweils mindestens 5 Jahre zurück lagen.

In keinem Fall war anamnestisch eine Diphtherieinfektion zu erfragen gewesen, ebenso war keiner der Probanden je an Pocken erkrankt.

10 % der Probanden wiesen eine komplette Tetanusimmunisierung auf, die wiederum in den meisten Fällen 5 Jahre zurücklag, 52 % der Probanden hatten irgendwann gesicherten Kontakt mit Tuberkelbakterien gehabt, 7 % gaben anamnestisch an, eine Rötelninfektion durchgemacht zu haben. Dasselbe gilt auch für die Patienten.

2.1.2 Patienten mit Histiozytose X

Wir untersuchten 20 Patienten mit der bioptisch gesicherten Diagnose Histiozytose X, 5 Frauen und 15 Männer im Alter von 19 bis 56 Jahren, Mittelwert 33 Jahre, Standardabweichung 12 Jahre. Alle Patienten wiesen diffusen Lungenbefall auf, vier, zwei Frauen und zwei Männer, zudem Knochenbefall.

Alle Patienten waren zum Zeitpunkt des Beginns der Studie klinisch symptomlos und erhielten weder eine krankheitsspezifische noch eine anders geartete Therapie.

Bei allen Patienten wurden die in der Folge beschriebenen immunfunktionellen Tests am Studientag 0 durchgeführt. 8 aus diesem Kollektiv zufällig ausgewählte Patienten, 7 Männer und 1 Frau, wurden mit Thymostimulin, einem aus Kalbsthymus extrahierten Polypeptidfaktor (Molekulargewicht ca. 4000 Dalton)(Tp-1 Sereno[®]) behandelt, und zwar durch intramuskuläre Applikation von jeweils 50 mg an Tag 1 bis einschließlich 8, sowie an den Tagen 16, 24 und 32. 12 Patientn, 8 Männer und 4 Frauen, blieben untherapiert. Am Tag 40 wurden bei allen Patienten die immunfunktionellen Tests wiederholt.

Die Patienten waren ordnungsgemäß aufgeklärt und mit der Aufnahme in die Studiengruppe einverstanden.

2.2 Immunfunktionelle Untersuchungen

2.2.1 Mitogen- und Antigenstimulation

2.2.1.1 Mitogenstimulation

Unter Mitogenen versteht man aus Pflanzen extrahierbare Substanzen mit der Eigenschaft, Lymphozyten zu transformieren (mitogene Wirkung (25)). Sie bringen in vitro immunologische Reaktionen in Gang, die ein Modell für die Reaktivität des Immunsystems in vivo darstellen dürften (22).

Concanavalin A (Con A) ist ein kohlehydratfreies Lectin der Schwertbohne (*Concavalia ensiformis*), das in vitro die DNS-Synthese und die mitotische Aktivität menschlicher T-Lymphozyten stimuliert. B-Lymphozyten können durch von diesen freigesetzte Mediatorsubstanzen stimuliert und auf diese Weise zur Mitreaktion veranlaßt werden (3, 190, 195). Ferner kann Con A die Entwicklung von Suppressorzellen induzieren (135).

Phytohämagglutinin (PHA) ist ein Mukoprotein der roten Nierenbohne (*Phaseolus vulgaris*) (121, 148). PHA stimuliert in vitro ebenfalls nur menschliche T-Lymphozyten, wenngleich B-Lymphozyten PHA ebenfalls an ihrer Oberfläche binden (43, 67, 78, 190, 195).

Pokeweed Mitogen (PWM) , ein Extrakt aus der Kermesbeere (Phytolacca americana), dagegen stimuliert vor allem B-Lymphozyten und regt sie zur Immunglobulinsynthese an. Ferner proliferieren unter der Einwirkung von PWM auch T-Lymphozyten, die wahrscheinlich die B-Zell-Proliferation durch Freisetzung von Lymphokinen weiter begünstigen (78, 137).

Staphylokokkenprotein A (Sp A) schließlich ist ein in der Zellwand der meisten Staphylokokkus aureus Stämme enthaltenes Protein, das in Agar gel mit menschlichen Gammaglobulinen präzipitiert. Es ist ebenfalls ein B-Zell-Mitogen (59, 60, 117).

Von allen Probanden wurden 1×10^5 Lymphozyten in Mikrotiterplatten (Greiner, Nürtingen) in 200 μ l Medium gegen folgende Endkonzentrationen der genannten Mitogene exponiert: 12,5 μ g Sp A (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Schweden), 12,5 μ g und 25 μ g Con A (Sigma Chemie, München), 2,5 μ g PWM und 1 μ g PHA (Gibco Europe, Glasgow, Schottland).

Die Kulturen wurden 3 Tage bei 37° C in feuchter CO₂-Atmosphäre inkubiert. Die Ansätze wurden 6-fach durchgeführt. Gemessen wurde der 3H-Thymidineinbau (Amersham International, Amersham, England) in die Lymphoblasten-DNS mittels Flüssigkeitsszintillation unter Verwendung einer 6 g PPO und 10 mg POPOP auf 1 l Toluol enthaltenden Szintillationsflüssigkeit (Carl Roth, Karlsruhe)(51).

2.2.1.2 Antigenstimulation

Antigene sind Substanzen, die nach parenteraler Applikation die Bildung spezifischer Antikörper induzieren, also ebenfalls Lymphozytenstimulatoren, jedoch spezifischere als Mitogene. Sie weisen Beziehungen auf zwischen Lymphozytenreaktivität in vitro und Antikörpertitern in vivo sowie zu Hautreaktionen. Sie eignen sich daher mindestens ebenso gut für in-vitro-Modelle immunologischer Vorgänge wie Mitogenkulturen.

Varidase ist ein Gemisch aus den extrazellulären Streptokokkenproteinen Streptokinase und Streptodornase, wobei das eigentliche lymphozytenstimulierende Antigen wahrscheinlich ein β -Globulin mit einem Molekulargewicht von 21 500 D ist. Die Stärke der lymphozytären Reaktion zeigt eine gute Korrelation zur Stärke der Hautreaktion vom verzögerten Typ (133, 177).

Tetanustoxoid ist ein entgiftetes Endotoxin von *Clostridium tetani*. Es stimuliert T-Lymphozyten immunisierter Individuen in Gegenwart von Makrophagen (133, 177).

Diphtherietoxoid, das entgiftete Ektotoxin von *Corynebacterium diphtheriae*, ist ein komplexes Protein, welches T-Lymphozyten vorimmunisierter und nichtimmunisierter Probanden stimuliert (110).

Tuberkulin ist ein Protein, welches aus Kulturfiltraten von *Mycobacterium tuberculosis* (typus humanus) gewonnen wird. Es bringt in vitro in Gegenwart von Makrophagen T-Lymphozyten zur Proliferation, nicht aber B-Lymphozyten. Probanden mit positivem Hauttest reagieren stärker als tuberkulinnegative Personen (53).

Vacciniaantigen enthält die Antigene des im Pockenimpfstoff enthaltenen, abgeschwächten Kuhpockenvirus und ist bezüglich seiner Antigenität weitgehend mit dem Kuhpockenvirus identisch. Es stimuliert vor allem T-Zellen, wahrscheinlich vorzugsweise T-Killerzellen (17, 40, 80, 99, 122).

Komplementbindendes Masernantigen, aus Masernvirus gewonnen, stimuliert in vitro konzentrationsabhängig T-Lymphozyten. Die Mehrzahl der T-Lymphozyten weist an ihrer Zelloberfläche Rezeptoren für dieses Virus auf (154, 181, 201).

Ebenso bringt komplementbindendes Rötelnantigen vor allem T-Zellen zur Proliferation (94).

Der Antigencocktail der Behringwerke setzt sich aus den verschiedenen bakteriellen und viralen Antigenen Streptolysin O, Tuberkulin GT, Tetanustoxoid, Mumpsantigen und Vacciniaantigen zusammen. Er stimuliert sowohl B- als auch T-Lymphozyten, wobei der 3H-Thymidineinbau in die Lymphoblasten-DNS bei Antigencocktail-

kulturen in der Regel höher ist als in den übrigen verwendeten Antigentestsystemen (51, 52).

Unter Verwendung der Antigene wurden analog den Stimulationsversuchen mit Mitogenen im Wesentlichen die gleichen Versuche durchgeführt; die Kulturen wurden lediglich 6 statt 3 Tage bei 38°C in feuchter CO₂-Atmosphäre inkubiert. Wir verwendeten folgende Endverdünnungen der vom Hersteller angegebenen Stammlösungen bakterieller und viraler Antigene:

2 ul Varidase (Lederle, Wolfratshausen), 2,5 ul Tetanustoxoid, 2,5 ul Diphtherietoxoid, 1ul Tuberkulin GT 1 und 0,5 ul Tuberkulin GT 10 (Behring, Marburg), was die bakteriellen Antigene betrifft, und 0,5 ul Masernantigen, 0,5 ug Vacciniaantigen, 16 ul Rötelnantigen (Behring, Marburg), was die viralen Antigene angeht.

Ferner kam der sogenannte Antigencocktail (OP 13, Behring, Marburg) zur Anwendung; die Ansätze wurden wiederum 6 mal durchgeführt und, wie unter 2.2.1.1 beschrieben, ausgewertet.

2.2.2 "Suppressorzellassay"

Zu Lymphozytensuspensionen von 10⁷ Zellen in 2,5 ml Kulturmedium wurde Concanavalin A (Sigma Chemie, München) bis zu einer Endkonzentration von 60 ug/ml gegeben und diese Zellsuspension 48 h lang bei einer Temperatur von 37°C in feuchter CO₂-Atmosphäre inkubiert (116, 165).

Bystanderzellen wurden nicht mit Con A stimuliert, ansonsten aber analog behandelt.

Die Responderzellen lagerten für diese 48 h unter flüssigem Stickstoff.

Zur Stimulation der Responderzellen wurde in der gemischten Lymphozytenkultur ein Lymphozytenpool von 5 gesunden, unverwandten, HLA-D-differenten Spendern verwendet, und in Mitogenkulturen die Mitogene Protein A, PWM und PHA. Zur Hemmung ihrer Proliferationsaktivität wurden Bystander-, Suppressor- und Stimulatorzellen in einer Cs-137-Quelle (Wälischmiller, Markdorf/Bodensee) mit

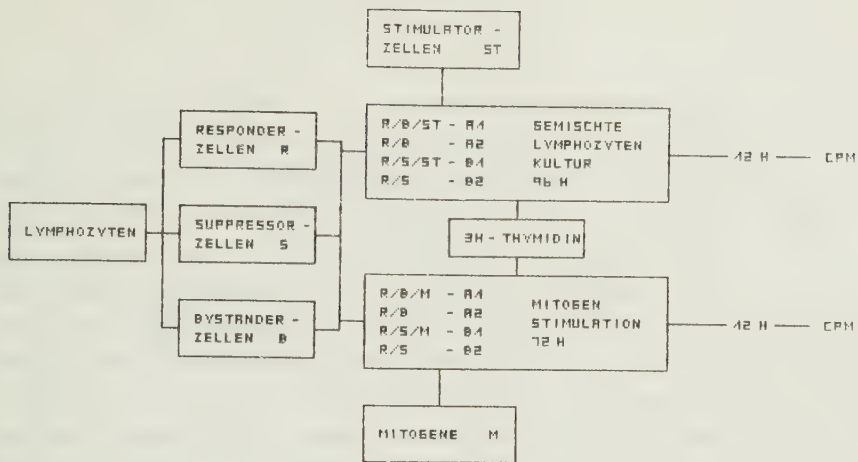


Abbildung 1: Suppressorzellassay.

Abkürzungen:

R = Responderzellen;

ST = Stimulatorzellen;

S = Suppressorzellen;

M = Mitogene.

B = Bystanderzellen;

A1 = Responderzellen in Gegenwart allogener Stimulatorzellen oder Mitogene und autologer Bystanderzellen;

A2 = Responderzellen in Gegenwart autologer Bystanderzellen allein;

B1 = Responderzellen in Gegenwart autologer Concanavalin A-behandelter Blutlymphozyten (Suppressorzellen) und allogener Stimulatorzellen oder Mitogene;

B2 = Responderzellen in Gegenwart autologer Concanavalin A-behandelter Blutlymphozyten (Suppressorzellen) allein;

cpm = counts per minute

40 Gy bestrahlt, während die Responderzellen natürlich unbestrahlt zum Einsatz kamen.

Um die durch Con A induzierte Suppressorzellaktivität zu bestimmen, stimulierten wir in Gegenwart von $5 \cdot 10^4$ Suppressorzellen $5 \cdot 10^4$ Responderzellen durch die oben genannten Mitogene in der Mitogenkultur und analog durch $5 \cdot 10^4$ Stimulatorzellen in der

gemischten Lymphozytenkultur (B1).

Als Kontrollen wurden analoge Stimulationen ohne Suppressorzellen in der Gegenwart von Bystanderzellen (zur Konstanterhaltung der Zellzahl) mitgeführt (A1).

Gleichzeitig wurden Mediumkontrollen mitgeführt, um die Rate der spontanen Zellteilungen zu erfassen (B2, A2). Dabei bezeichnen wir als Kontrolle B2 Responderzellen und Suppressorzellen ohne Stimulation und als A2 ebenfalls unstimulierte Responderzellen und Bystanderzellen.

Die Mediumkontrolle erschien uns, im Gegensatz zu anderen Untersuchern (61, 165) unverzichtbar, da Con-A-induzierte Blasten auch bestrahlt 3H-Thymidin einbauen, und deshalb die Responder-Suppressor-Counts (B1) mitunter höher sind als die Responder-Bystander-Counts (A1) (51, 52).

Alle Experimente wurden 6-fach durchgeführt und der 3H-Thymidineinbau mittels Flüssigkeitsszintillation gemessen.

Die prozentuale Hemmung der Blastopoese der Responderzellen durch Con-A-traktierte Lymphozyten ermittelten wir anhand der gemessenen counts per minute nach folgender Formel:

$$\text{Suppression (\%)} = (1 - (B1 - B2) : (A1 - A2)) * 100$$

Arithmetisch negative Suppressionswerte wurden gleich 0 % gesetzt.

Eine schematische Darstellung des von uns durchgeführten Suppressorzellansatzes gibt Abbildung 1.

Die Validität dieses Tests erscheint jedoch fraglich, da nach neueren Erkenntnissen die Suppressorzellnatur der Concanavalin-A aktivierten Lymphozyten nicht mehr als gesichert gelten kann (126). Im folgenden wird deshalb die solcherart ermittelte Suppressorzellaktivität in Anführungszeichen gesetzt, oder als Aktivität Con A-induzierter Blasten bezeichnet.

2.3 T-Zellsubfraktionen

Mittels monoklonaler Antikörper wurden die T-Zellsubfraktionen im Immunfluoreszenzassay bestimmt (Ortho Diagnostic Systems, Raritan, New Jersey, USA). Dabei steht OKT 3 für alle T-Zellen, OKT 4 für die T-Helferzellen und OKT 8 für T-Suppressor und zytotoxische T-Zellen (6, 100, 145, 146). Die Auswertung erfolgte am Immunfluoreszenzmikroskop (Orthoplan, Leitz, Wetzlar).

Im Monoklonalenassay wurden die relativen Kompartimentarößen ermittelt und daraus anhand des aktuellen Blut- und Differentialblutbildes die absoluten Werte errechnet. Ebenfalls wurde das Helfer-Suppressorzellverhältnis bestimmt (OKT 4/8). Grundprinzip dieses Ansatzes siehe Abbildung 2.

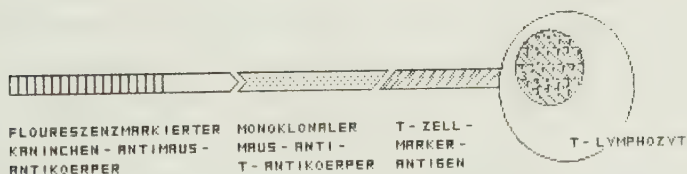


Abbildung 2: Grundprinzip der T-Zellsubpopulationsbestimmung mit monoklonalen Antikörpern

2.4 Immungenetische Untersuchungen

Bei allen Probanden wurden die HLA-A, -B, -Cw und -DR-Antigene im Mikrozytotoxizitätstest nach Terasaki bestimmt (16).

2.4.1 HLA-A, -B, -Cw-Antigene

Die Lymphozyten einer heparinisierten Blutprobe (5 ml) eines jeden Probanden wurden mit der gleichen Menge einer Ca- und Mg-freien Verdünnungslösung (Hanks Solution, Gibco Limited, Paisely, Schottland) versetzt und über einem Dichtegradienten ($d = 1.077 \text{ g/ml}$) (Ficoll Isopaque, Apotheke der Klin. Universitätsanstalt, München) separiert. Die Lymphozyten, die sich als weißer Ring an der Grenze zwischen Plasma und Ficoll absetzen, werden abgehebert, zweimal gewaschen, nochmals 5 min bei 1500 Upm (350 g) zentrifugiert und das so gewonnene Lymphozytensediment mit Hanks Solution zu einer endgültigen Konzentration von 3000 bis 4000 Zellen aufgeschwemmt. In mit Decköl gefüllte und jeweils mit 1 ul Anti-HLA-Serum (Biotest, Frankfurt) beschickte Mikrotestkammern (Greiner, Nürtingen) wird jeweils 1 ul der eingestellten Zellsuspension unter die Ölschicht eingebracht und 30 min bei Zimmertemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 5 ul Kaninchenkomplement (Behring, Marburg) pro Napf wird erneut 60 min lang inkubiert, mit 2 ul Eosin 2 min angefärbt und mit Formaldehydlösung (pH 7,2) fixiert. Die Mikrotestplatten werden nach 10 min mit einem Deckglas abgedeckt und können nach 1 - 24 h ausgewertet werden. Die Auswertung erfolgt im Phasenkontrastmikroskop (Leitz, Wetzlar) anhand des Anteils der positiven Reaktionen (positive, d.h. tote, Zellen sind dunkler und größer als lebende Zellen), die als Scorewert angegeben werden. (Anteil der positiven Zellen bis 10 % = 1 Score = negativ; 20 % = 2 Score; 50 % = 4 Score; 75 % = 6 Score. 100 % = 8 Score), HLA-Positiv- und Negativkontrollen werden mitgeführt. Schwach positive Negativkontrollen wurden bei der Auswertung berücksichtigt, bei starker positiven Negativkontrol-

len wurde der Versuch für den einzelnen Probanden jeweils wiederholt.

2.4.2 HLA-DR-Antigene

Da das DR-Antigen nur auf B-Lymphozyten nachweisbar ist, muß nach der Isolierung der Lymphozyten noch eine Trennung in B- und T-Lymphozyten erfolgen.

Für jeden Probanden wurden 2 2 ml-Einmalspritzen mit Nylonwatte locker gestopft und mit auf 37°C erwärmter Hanks Lösung gespült. Das Lymphozytensediment wurde mit warmem Medium (Lymphostabil, Biotest, Frankfurt) und 5 % aktiviertem Kälberserum (Gibco, Paisely, Schottland) aufgeschwemmt und sofort auf die Trennsäule gegeben. Die Spritze wurde mit Parafilm verschlossen und 30 min bei 37°C inkubiert.

Die nicht haftenden T-Lymphozyten werden mit 10 ml auf 37°C erwärmtem Medium ausgespült und verworfen, die haftenden B-Zellen in ein silikonisiertes Glasröhrchen ausgepreßt. Die derart gewonnenen B-Zellen werden 10 min bei 1000 Upm (150 g) zentrifugiert und das Sediment wiederum auf 3000 bis 4000 Zellen eingestellt. Die Ansätze wurden jeweils doppelt durchgeführt, es wurde jeweils eine vorgetropfte Mikrotestkammer der Firmen Biotest, Frankfurt und Fresenius, Oberursel/Ts. verwendet.

Die Typisierung erfolgt wie bei den Klasse-I-Antigenen, jedoch bei jeweils doppelter Inkubationszeit.

Eine Gesamtübersicht über die durchgeführten Untersuchungen gibt Tabelle 1.

Immunfunktionelle Untersuchungen

1. Mitogenstimulation: Protein A (SpA), Concanavalin A (Con A), Pokeweed Mitogen (PWM), Phythämoagglutinin (PHA)
 2. Antigenstimulation: Varidase, Tetanustoxoid, Diphterietoxoid, Tuberkulin, Vacciniaantigen, Masernantigen, Rötelnantigen, Antigencocktail
 3. Suppressorzellen: Protein A (SpA), Pokeweed Mitogen (PWM), Phytohämagglutinin, Gemischte Lymphozytenkultur (MLC)
-

Bestimmung von T-Lymphozyten und T-Zell-Subfraktionen

1. OKT 3: Alle T-Zellen
 2. OKT 4: T-Helferzellen
 3. OKT 8: T-Suppressorzellen
 4. OKT 4/8: Helfer-Suppressorzellverhältnis
-

Immungenetische Untersuchungen

1. HLA-A, -B, -Cw-Antigene
 2. HLA-DR-Antigene
-

Tabelle 1: Gesamtübersicht der durchgeführten Untersuchungen

2.5 Statistische Analysen

2.5.1 T-Test

Zur Auswertung der Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen verwendeten wir den Student T-Test für ungleiche Stichproben ungleicher Varianz.

Die resultierenden Irrtumswahrscheinlichkeiten sind bei der Vielzahl der Tests und der Korrelation der Merkmale nicht im konfirmatorischen Sinn als korrekt anzusehen. Die angegebenen p-Werte werden als deskriptive Meßzahl betrachtet. Dies gilt auch für die unter 3.2 beschriebenen Werte der Clusteranalyse, in der im Rahmen des F-Tests auch eine Prüfung auf Normalverteilung erfolgte.

Für die gemessenen Werte lag zwar im Gesamtkontrollkollektiv keine Normalverteilung vor, wohl aber in den durch die Multivarianzanalyse (siehe 2.5.2) aufgedeckten Gruppen, die sich hinter dem Gesamtkollektiv verbergen.

2.5.2 Clusteranalyse

Um die Frage zu klären, ob sich im Normalprobandenkollektiv Gruppen finden lassen, die bezüglich der vorgegebenen Menge von Parametern als ähnlich angesehen werden können und sich bezüglich dieser Parameter von anderen Gruppen unterscheiden, wurde zusätzlich eine sogenannte Multivarianz- oder Clusteranalyse durchgeführt (51, 52). Diese wurde an der University of California konzipiert und im Verlauf dort mathematisch-experimentell verbessert und weiterentwickelt (BMDP2M - Cluster Analysis of Cases; BMDP Statistical Software Inc., 1964 Westwood Blvd Suite 202 (213) 4755700; Program revised April 1982 - Manual revised 1981; Copy-right (C) 1982 Regents of University of California).

Alle Daten der Einzeltestsysteme gingen gleichwertig in die Clusteranalyse ein. Als Ähnlichkeits- oder Abstandsmaß wurde die mit der inversen Kovarianzmatrix gewichtete Summe der Differenz-

quadrate zwischen den einzelnen Parametern der Probanden genommen, und dieser sogenannte Rao-Abstand für jedes Probandenpaar berechnet. Anschließend wurde ein Amalgamationsprozeß durchgeführt, wobei zunächst das Probandenpaar mit dem geringsten Rao-Abstand zu einem Cluster zusammengefaßt und dieser Cluster durch die Mittelwerte seiner immunologischen Parameter gekennzeichnet wurde. Dann wurde der Abstand jedes Probanden zu diesem Cluster berechnet. Hatte ein Proband einen minimalen Abstand zu diesem Cluster, wurde er ihm zugeordnet; andernfalls wurde er mit dem Probanden, der den geringsten Abstand zu ihm besaß, zu einem neuen Cluster zusammengefaßt usw. Das heißt, es wurde ein Clustering nach Fällen durchgeführt, wobei jeder Fall (= Proband) durch eine Menge von immunologischen Meßgrößen ($n = 26$) repräsentiert wurde. Das heißt für den konkreten Fall auch, daß ein Proband, der beispielsweise auf PWM sehr hoch reagiert, in allen anderen getesteten Systemen jedoch sehr niedrig, einer Niedrigreagentengruppe zugeordnet wird, ein Proband, der auf PWM niedrig reagiert, in anderen Testsystemen jedoch sehr hoch, dem Hochreagentencluster.

Zur Überprüfung, inwieweit sich so ermittelte Gruppen statistisch signifikant voneinander unterscheiden, wurden als Diskriminanzanalysen der F-Test und im Hinblick auf jedes Einzeltestsystem erneut der T-Test für unverbundene Stichproben ungleicher Varianz gerechnet.

Eine statistische Signifikanz wurde bei F-Werten >4 und p-Werten $<0,05$ angenommen.

Die Clusteranalysen wurden am Institut für Biometrie der Medizinischen Hochschule Hannover (Prof. Dr. B. Schneider) vorgenommen.

2.5.3 Relatives Risiko

Das relative Risiko (rR) ist ein Maß für die Stärke der Assoziation eines Faktors, hier eines HLA-Gens zu einer Gruppe. Bei einem relativen Risiko > 1 spricht man von einer positiven, bei einem $rR < 1$ von einer negativen Assoziation. Ist das $rR \leq 2$, spricht man definitionsgemäß von einer biologischen Signifikanz. Das relative Risiko berechnet sich nach der Formel

$$rR = \frac{\text{Zahl der positiven Probanden} * \text{Zahl der negativen Kontrollen}}{\text{Zahl der positiven Kontrollen} * \text{Zahl der negativen Probanden}}$$

Die prozentuale Verteilung der HLA-Gene in den verschiedenen durch die Clusteranalyse ermittelten Gruppen wurde berechnet, sowie das relative Risiko für die Zugehörigkeit zu einer bestimmten Gruppe anhand des gehäuften Auftretens bestimmter HLA-Gene in dieser Gruppe. Dabei dienten für das Normalprobandenkollektiv jeweils die beiden anderen Cluster, für die Histiozytose X-Gruppe das gesamte Normalprobandenkollektiv als Kontrollgruppe.

In einem zweiten Schritt wurde überprüft, ob in einer bestimmten Gruppe biologisch signifikant vermehrte HLA-Gene bei den einzelnen Angehörigen dieser Gruppe auch vermehrt kombiniert vorkommen. Die prozentuale Häufigkeit dieser Genkombinationen in den verschiedenen Gruppen wurde berechnet, sowie das rR für die Zugehörigkeit zu einer bestimmten Gruppe in Bezug auf die Genkombinationen.

Schließlich wurde überprüft, welchem der immunfunktionell differnten Kontrollkluster die Histiozytose X-Gruppe bezüglich biologisch signifikanter Einzelgen- oder Genkombinationsvermehrungen am ähnlichsten ist.

Die mathematische Signifikanz für biologisch signifikant vermehrte Einzelgene und Genkombinationen wurde mit dem Exakten Fischer Test berechnet. Jedoch ist einzuwenden, daß die Aussagefähigkeit mathematischer Signifikanzen bei dem im Verhältnis zu dem enormen Polymorphismus des HLA-Systems kleinen Stichprobenumfang die der

biologischen Signifikanzen nicht wesentlich übersteigen dürfte. Deshalb führten wir über die beim Einzelprobanden gefundene HLA-Genverteilung eine Reklassifizierung in die durch die Clusteranalyse festgelegten Gruppen durch, um zu prüfen, ob es überzufällig häufig (>33 %) gelingen würde, Probanden allein aufgrund des bei ihnen gefundenen Gen-Musters richtig ihrem durch immunfunktionelle Parameter definierten Cluster zuzuordnen.

3 Ergebnisse

3.1 Analyse der Ergebnisse im T - Test

3.1.1 Mitogen- und Antigenstimulation

3.1.1.1 Mitogenstimulation

In unseren Untersuchungen fanden wir, daß Lymphozyten von Patienten mit Histiozytose X auf Stimulation mit SpA und ConA 25 ug signifikant ($p < 0,05$) stärker reagieren als Lymphozyten der Normalprobanden. In den anderen Mitogen-Testsystemen (ConA 12,5 ug, PWM, PHA) unterscheiden sich die beiden Gruppen nicht.

Nach Therapie mit Thymostimulin reagierten die Patientenlymphozyten gegen alle verwendeten Mitogene signifikant ($p < 0,05 - 0,001$) stärker als die Patienten des Kontrollkollektivs (Tab. 2, Abb. 3 - 7).

3.1.1.2 Antigenstimulation

Auf die Stimulation mit Antigenen reagieren die Lymphozytenen von Patienten mit Histiozytose X in den meisten Ansätzen (Varidase, Tetanustoxoid, Tuberkulin GT 1, Tuberkulin GT 10, Masernantigen, Vacciniaantigen, Antigencocktail) wie die der Normalprobanden. Signifikant ($p < 0,02$) niedriger war die Reaktion der Patientenlymphozyten im Vergleich zu denen der Normalprobanden bei Stimulation mit Diphtherietoxoid und Rötelnantigen. Nach Therapie bestehen auch in den beiden letztgenannten Testsystemen keine signifikanten Unterschiede mehr, während die Reaktion auf Tetanustoxoid und Antigencocktail jetzt deutlich ($p < 0,02 - 0,01$) höher ist als die des Normalprobandenkollektivs (Tab. 3, Abb. 8 - 11).

Mitogene	HX (20)		Kontrollen (88)			HX nach Therapie (8)		
	MW	SD	p<	MW	SD	p<	MW	SD
SpA	4612	6717	0,05	2155	2382	0,01	7345	9526
Con A 25 ug	34588	26518	0,05	21104	23100	0,01	55614	41379
Con A 12,5 ug	19549	19979	n.s.	11815	12057	0,05	27371	24087
PWM	31410	23259	n.s.	20440	21426	0,05	38557	29432
PHA	106074	80230	n.s.	119266	82810	0,001	275285	143855

Tabelle 2: Lymphozytenreaktivität auf Mitogene (cpm) bei Normalprobanden sowie bei Patienten mit Histiozytose X (HX) vor und nach Therapie mit Thymostimulin

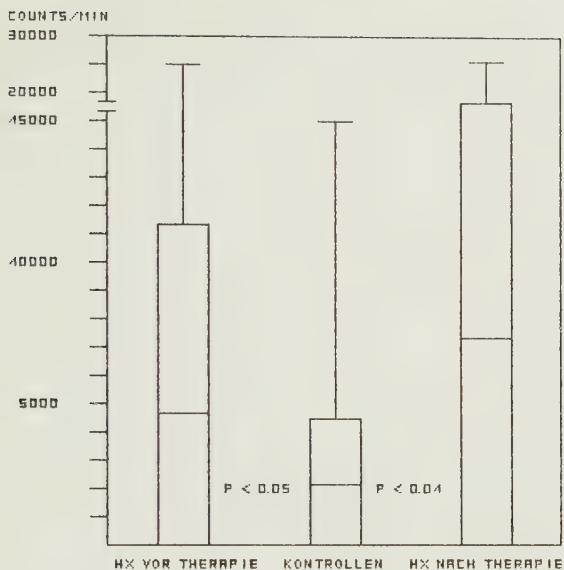


Abbildung 3: Lymphozytenreaktivität auf Protein A.
Lymphozyten von Patienten mit Histiozytose X reagieren sowohl vor als auch nach Therapie mit Thymostimulin signifikant stärker auf Stimulierung mit Protein A als die der Kontrollgruppe.



Abbildung 4: Lymphozytenreaktivität auf Concanavalin A (25 ug).

Lymphozyten von Patienten mit Histiocytoze X reagieren sowohl vor als auch nach Therapie mit Thyostimulin signifikant stärker auf Stimulierung mit Concanavalin A als die der Kontrollen.

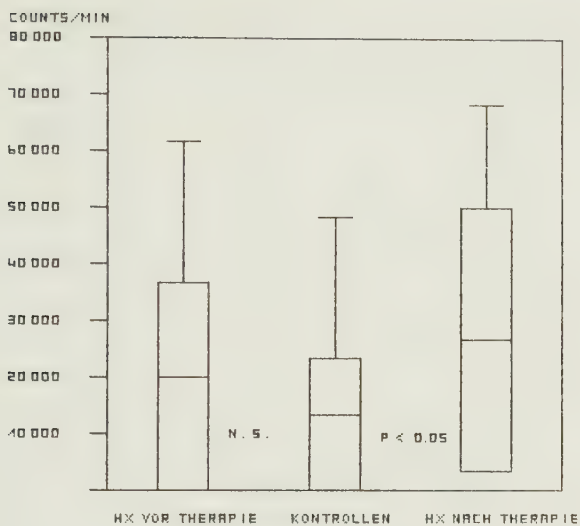


Abbildung 5: Lymphozytenreaktivität auf Con A (12.5 ug). Die Lymphozytenreaktivität von Patienten mit Histiozytose X auf Stimulation mit Concanavalin A unterscheidet sich nicht von der der Kontrollgruppe, nach Therapie mit Thymostimulin ist sie signifikant höher als die der Kontrollen.

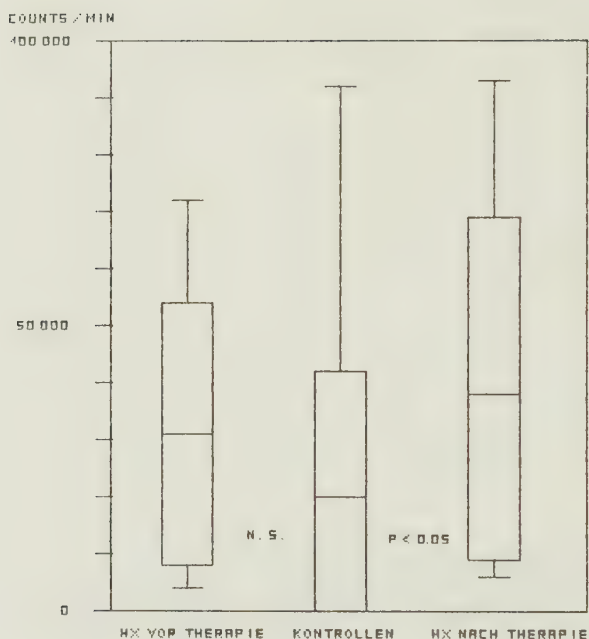


Abbildung 6: Lymphozytenreaktivität auf Pokeweed Mitogen. Die Lymphozytenreaktivität von Patienten mit Histiocyotose X auf Stimulierung mit Pokeweed Mitogen unterscheidet sich nicht signifikant von der der Kontrollgruppe, nach Therapie mit Thymostimulin ist sie signifikant höher als die der Kontrollgruppe.

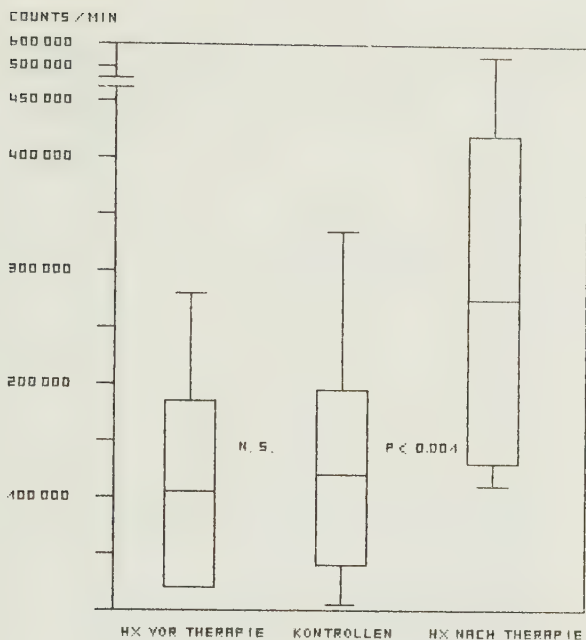


Abbildung 7: Lymphozytenreaktivität auf Phytohämagglutinin. Die Lymphozytenreaktivität von Patienten mit Histiocyotose X auf Stimulierung mit Phytohämagglutinin unterscheidet sich vor Therapie mit Thymostimulin nicht von der Kontrollgruppe; nach Therapie ist sie signifikant höher als die der Kontrollen.

Antigene	HX (20)			Kontrollen (88)			HX nach Therapie (8)		
	MW	SD	p<	MW	SD	p<	MW	SD	
Varidase	1720	1073	n.s.	3807	6734	n.s.	3965	3564	
Tetanustoxoid	6892	7338	n.s.	10439	19065	0.02	19534	9112	
Diphtherietoxoid	2575	574	0.02	10397	34691	n.s.	4612	1990	
Tuberkulin GT 1	1788	1039	n.s.	2485	3453	n.s.	3200	2894	
Tuberkulin GT 10	2102	1377	n.s.	2584	3828	n.s.	3186	1883	
Masernantigen	1225	810	n.s.	1684	2301	n.s.	1830	1588	
Vacciniaantigen	2074	1941	n.s.	4220	8777	n.s.	4146	2429	
Rötelnantigen	939	654	0.02	2053	3307	n.s.	2717	3054	
Antigencocktail	18166	29738	n.s.	13699	21165	0.01	53525	28981	

Tabelle 3: Lymphozytenreaktivität auf Antigene (cpm) bei Normalprobanden sowie bei Patienten mit Histiozytose X (HX) vor und nach Therapie mit Thymostimulin

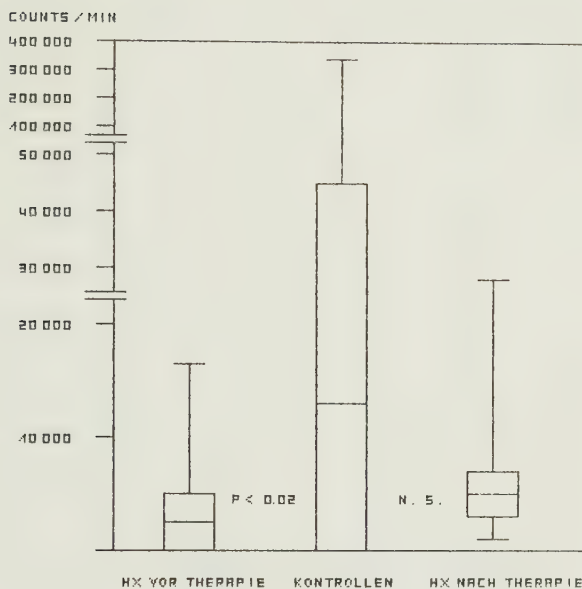


Abbildung 8: Lymphozytenreaktivität auf Diphterietoxoid.
Die Lymphozyten von Patienten mit Histiozytose X reagieren auf Stimulation mit Diphterietoxoid signifikant niedriger als die der Kontrollgruppe, nach Therapie mit Thymostimulin verhalten sie sich kontrollgruppenanalog.

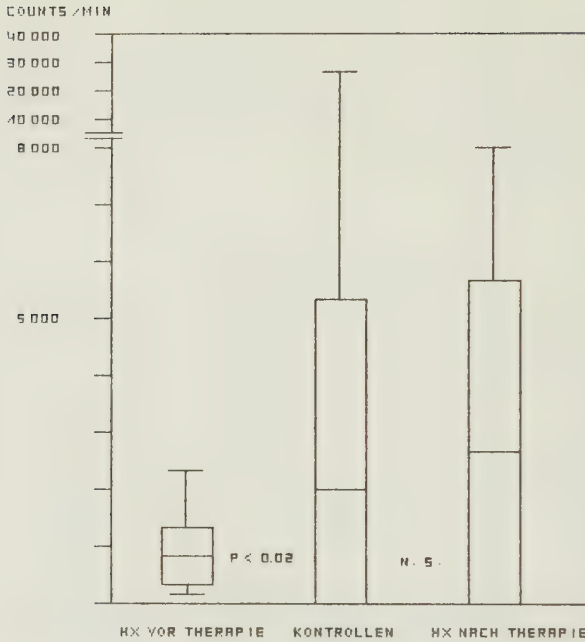


Abbildung 9: Lymphozytenreaktivität auf Rötelnantigen. Die Lymphozyten von Patienten mit Histiozytose X reagieren auf Stimulation mit Rötelnantigen signifikant niedriger als die der Kontrollgruppe, nach Therapie mit Thymostimulin verhalten sie sich kontrollgruppenanalog.

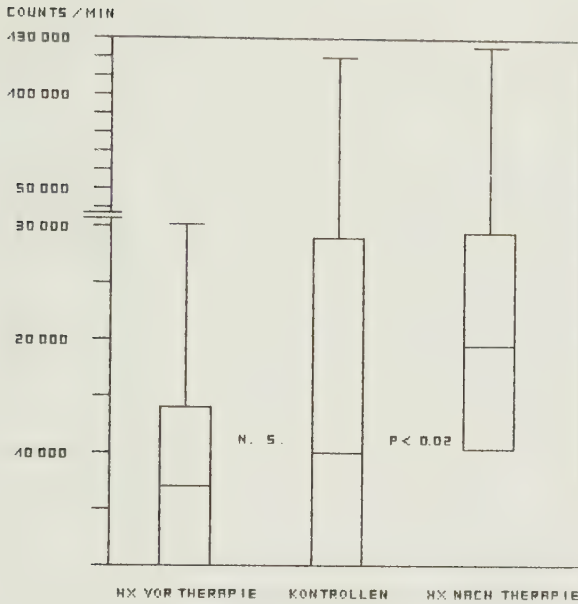


Abbildung 10: Lymphozytenreaktivität auf Tetanustoxoid.
Die Lymphozytenreaktivität von Patienten mit Histiozytose X auf Stimulation mit Tetanustoxoid ist vor Therapie mit Thymostimulin kontrollgruppenanalog, nach Therapie signifikant höher als die der Kontrollgruppe.

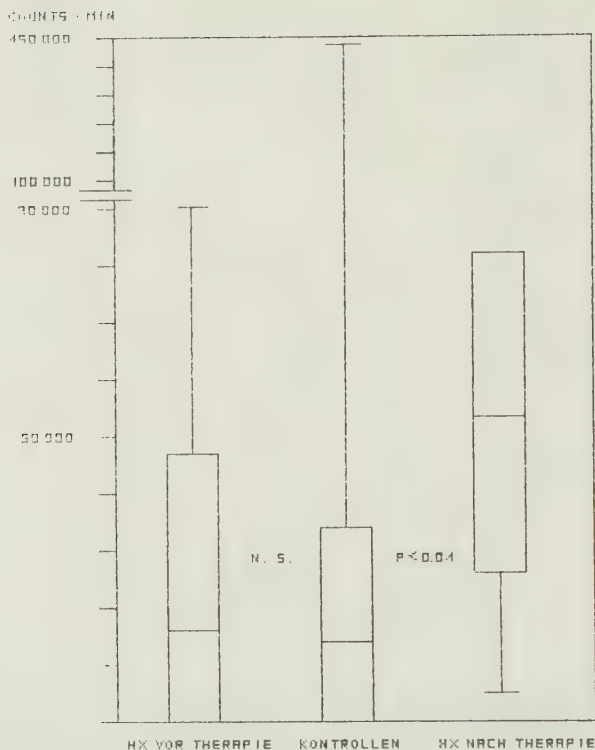


Abbildung 11: Lymphozytenreaktivität auf Antigenscocktail.
Die Lymphozytenreaktivität von Patienten mit Histiozytose X auf Antigenscocktail ist vor Therapie mit Thymostimulin kontrollgruppenanalog, nach Therapie signifikant höher als die der Kontrollgruppe.

3.1.2 "Suppressorzellaktivität"

In den einzelnen Testsystemen im "Suppressorzellassay" (Stimulation der Responderzellen mit SpA, PWM, MLC) zeigt sich die Aktivität Concanavalin A-induzierter Blasten von den Patienten signifikant ($p < 0,05 - 0,001$) niedriger als die der gesunden Probanden. Eine Ausnahme macht der Ansatz mit PHA; hier findet sich kein Unterschied in der Reaktivität der Vergleichsgruppen.

Nach Therapie mit Thymostimulin ist die Aktivität in allen Testsystemen bei den Patienten deutlich höher als vor Therapie und damit unterscheidet sie sich nicht mehr von der Aktivität der Con A-induzierten Blasten der Normalprobanden (Tab. 4. Abb. 12 - 14).

3.1.3 T-Zellsubfraktionen

Die Bestimmung der T-Zellsubfraktionen ergibt eine signifikant erniedrigte T-Helferzellzahl bei den Patienten mit Histiozytose X im Vergleich zum Normalprobandenkollektiv, und zwar sowohl relativ ($p < 0,02$) als auch absolut ($p < 0,002$), wogegen nach Therapie keine Unterschiede in den Vergleichsgruppen bestehen.

Die relative T-Zellzahl (OKT 3) unterscheidet sich zwischen den Gruppen weder vor noch nach Therapie, während die absolute T-Zellzahl in der Patientengruppe vor Therapie erniedrigt ($p < 0,03$), nach Therapie wie die der Kontrollgruppe ist.

Bei therapierten wie untherapierten Patienten finden wir keine signifikanten Unterschiede in OKT 8 und den absoluten Zahlen der T-Suppressor und zytotoxischen T-Zellen im Vergleich zu denen der Normalprobanden.

Ebenso bestehen keine Unterschiede in der Gesamtlymphozytenzahl (Tab. 5 und 6, Abb. 15 - 17).

Testsystem	HX (20)			Kontrollen (88)			HX nach Therapie (8)		
	MW	SD	p<	MW	SD	p<	MW	SD	
SpA	16	30	0,05	33	40	n.s.	25	30	
PWM	16	24	0,03	36	38	n.s.	46	17	
PHA	32	17	n.s.	32	35	n.s.	54	26	
MLC	14	37	0,001	56	35	n.s.	51	34	

Tabelle 4: "Suppressorzellaktivität" (%) bei Normalprobanden sowie bei Patienten mit Histiozytose X (HX) vor und nach Therapie mit Thymostimulin

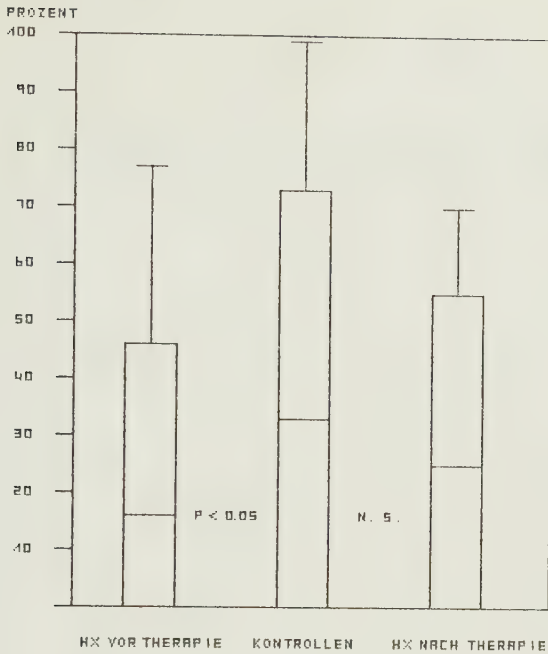


Abbildung 12: "Suppressorzellaktivität" (%).
Patienten mit Histiozyose X zeigen vor Therapie mit Thymostimulin im Protein-A-Testsystem eine signifikant niedrigere "Suppressorzellaktivität" als die Probanden der Kontrollgruppe, nach Therapie verhalten sie sich kontrollgruppenanalog.

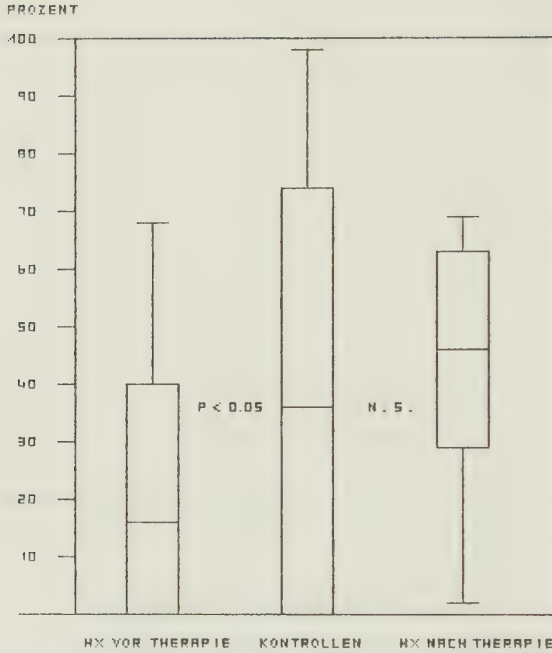


Abbildung 13: "Suppressorzellaktivität" (%).

Die "Suppressorzellaktivität" von Patienten mit Histiozytose X ist im Pokeweed-Mitogen-System vor Therapie mit Thymostimulin gegenüber der Kontrollgruppe signifikant erniedrigt, nach Therapie kontrollgruppenanalog.

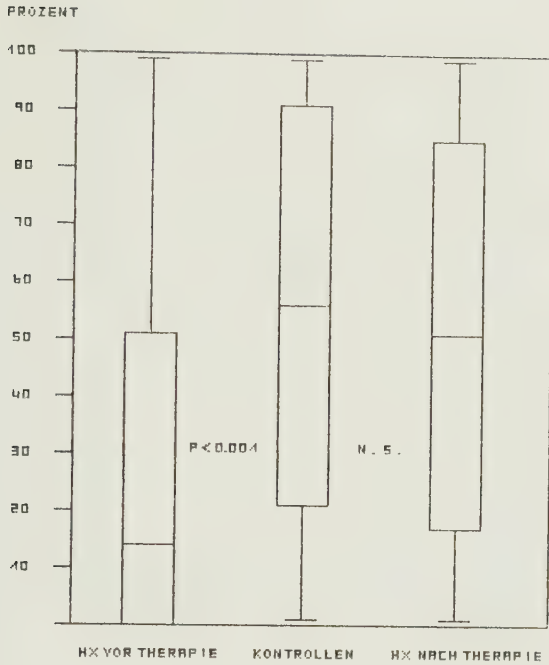


Abbildung 14: "Suppressorzellaktivität" (%).

Die "Suppressorzellaktivität" von Patienten mit Histiozytose X ist in der gemischten Lymphozytenkultur (MLC) signifikant niedriger als die der Kontrollgruppe, nach Therapie mit Thymostimulin kontrollgruppenanalog.

	HX (20)			Kontrollen (88)			HX nach Therapie (8)		
	MW	SD	p<	MW	SD	p<	MW	SD	
T-Zellen, gesamt									
(OKT 3)	42	8	n.s.	42	13	n.s.	45	12	
T-Helferzellen									
(OKT 4)	16	12	0.02	25	10	n.s.	25	18	
T-Suppressor- und zytotoxische									
T-Zellen (OKT 8)	19	7	n.s.	19	7	n.s.	25	9	
OKT 4/8	0,8	1,0	n.s.	1,5	0,9	n.s.	1,0	0,5	

Tabelle 5: T-Zell-Subfraktionen (%) bei Normalprobanden sowie bei Patienten mit Histiozytose X (HX) vor und nach Therapie mit Thymostimulin

	HX (20)		p<	Kontrollen (88)		p<	HX nach Therapie (8)	
	MW	SD		MW	SD		MW	SD
Lymphozyten	1801	773	n.s.	2067	612	n.s.	2088	502
T-Zellen	773	412	0,03	1031	375	n.s.	963	445
T-Helferzellen	310	233	0,002	617	280	n.s.	507	375
T-Suppressor- und zytotoxische								
T-Zellen (OKT 8)	373	262	n.s.	482	214	n.s.	433	260

Tabelle 6: T-Zell-Subfraktionen (absolut/ul) bei Normalprobanden sowie bei Patienten mit Histiozytose X (HX) vor und nach Therapie mit Thymostimulin

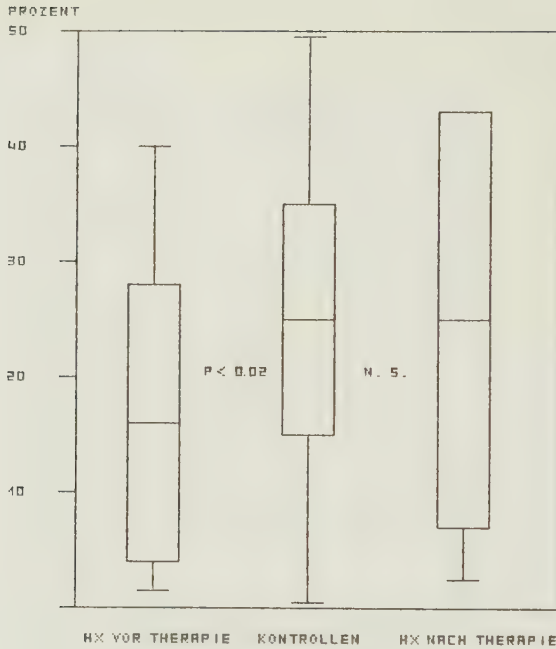


Abbildung 15: T-Helferzellen (%).

Der prozentuale Anteil der T-Helferzellen an den Lymphozyten des peripheren Blutes ist bei Patienten mit Histiozytose X signifikant erniedrigt, nach Therapie mit Thymostimulin ist er kontrollgruppenanalog.



Abbildung 16: T-Helferzellen (absolut/ul).

Bei Patienten mit Histiozytose X ist die absolute T-Helferzellzahl pro Mikroliter peripheren Blutes gegenüber der Kontrollgruppe erniedrigt, nach Therapie ist sie kontrollgruppenanalog.

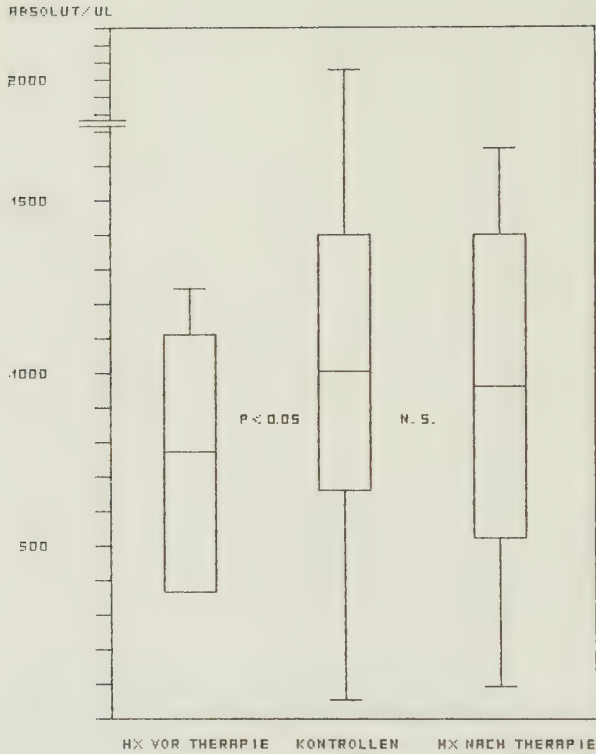


Abbildung 17: T-Zellzahl (absolut/ul).

Bei Patienten mit Histiocyotose X ist die T-Zellzahl pro Mikroliter peripheren Blutes gegenüber der Kontrollgruppe signifikant erniedrigt, nach Therapie mit Thymostimulin kontrollgruppenanalog.

3.2 Clusteranalyse

3.2.1 Normalprobandenkollektiv

Wie unter 2.5.2 erläutert, gingen die immunologischen Parameter der gesunden Kontrollpersonen in eine sogenannte Clusteranalyse ein. Dabei zeigte sich, daß dieses Kollektiv in Bezug auf sein immunologisches Verhalten offenbar nicht homogen ist, sondern in verschiedene Gruppen (Cluster) zerfällt, nämlich in eine Gruppe 1 mit 18 Probanden, eine Gruppe 2 mit 49 Probanden und eine Gruppe 3 mit 21 Probanden.

Die Zusammensetzung der Cluster unterscheidet sich weder nach Alter (Cluster 1: MW = 30 Jahre, SD = 9 Jahre; Cluster 2: MW = 30 Jahre, SD = 9 Jahre; Cluster 3: MW = 31 Jahre, SD = 8 Jahre) noch nach Geschlecht (Cluster 1: 72 % Frauen, 28 % Männer; Cluster 2: 71 % Frauen, 29 % Männer; Cluster 3: 62 % Frauen, 38 % Männer).

Gruppe 1 unterscheidet sich im T-Test in allen Mitogentestsystemen hochsignifikant ($p < 0,005 - 0,00005$) und in den Antigentestsystemen in 5 von 9 Ansätzen ebenfalls signifikant bis hochsignifikant ($p < 0,05 - 0,005$) von der Gruppe 2. Sie unterscheiden sich nicht in Bezug auf Varidase, Tuberkulin GT 1, Tuberkulin GT 10 und Rötelnantigen. Von Gruppe 3 unterscheidet die Gruppe 1 die Reaktivität in der Mitogenstimulierung signifikant ($p < 0,01 - 0,005$), bis auf SpA und Con A (12,5 ug), und in der Antigenstimulierung in 8 von 9 bestimmten Parametern, ebenfalls wieder signifikant ($p < 0,01 - 0,0005$); eine Ausnahme bildet hier das Ergebnis der Tetanustoxoidstimulierung.

Die Gruppen 2 und 3 unterscheiden sich in allen Mitogen- und Antigentestansätzen signifikant bis hochsignifikant ($p < 0,03 - 0,00005$) (Tab. 7 - 10, Abb. 18 - 31).

Da nun die Mittelwerte der Gruppe 3 durchweg höher liegen als die der Gruppen 1 und 2 bezeichnen wir die Angehörigen dieser Gruppe als Hochreagenten, die Probanden der Gruppe 2 mit den durchwegs niedrigsten Mittelwerten als Niedrigreagenten und die der Gruppe 1 als Mittelhochreagenten.

Keine signifikanten Unterschiede zwischen den 3 Clustern konnten im T-Test bei der "Suppressorzellaktivität" und bei den relativen sowie absoluten T-Zellkompartimenten gefunden werden (Tab. 11 - 16).

Mitogene	Gruppe 1 (18)		Gruppe 2 (49)		Gruppe 3 (21)	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD
SpA	3023	3030	1434	892	3478	3657
Con A (25 ug)	37705	25560	10985	11934	27822	30481
Con A (12.5 ug)	17206	11178	4905	4766	20336	14312
PWM	24570	18565	10451	11098	35215	22680
PHA	147362	75529	82103	70330	188656	79764

Tabelle 7: Lymphozytenreaktivität (cpm) auf Mitogene in den 3 Gruppen (Clustern) des Normalprobandenkollektivs: Hohe Reaktivität in Gruppe 3, mittelhohe Reaktivität in Gruppe 1 und niedrige Reaktivität in Gruppe 2

Antigene	Gruppe 1 (18)		Gruppe 2 (49)		Gruppe 3 (21)	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD
Varidase	2377	1707	2167	2389	9429	12508
Tetanustoxoid	12102	13442	2597	3235	23287	27823
Diphtherietoxoid	5370	6902	1973	5215	36454	69109
Tuberkulin GT 1	1930	1445	1483	1265	5582	6185
Tuberkulin GT 10	2157	2007	1456	1255	5377	6626
Masernantigen	1512	969	1010	592	3527	4371
Vacciniaantigen	2407	1376	1602	1101	12061	16606
Rötelnantigen	1481	1377	1281	1156	4541	6245
Antigencocktail	8548	10172	5834	7956	38063	31812

Tabelle 8: Lymphozytenreaktivität (cpm) auf Antigene in den 3 Gruppen (Clustern) des Normalprobandenkollektivs: Hohe Reaktivität in Gruppe 3, mittelhohe Reaktivität in Gruppe 1 und niedrige Reaktivität in Gruppe 2

Mitogene	F>	Gruppe 1/2		Gruppe 1/3		Gruppe 2/3	
		p<		p<		p<	
SpA	6,9	0,003		n.s.		0,01	
Con A (25 ug)	12,7	0,0005		0,005		0,01	
Con A (12,5 ug)	25,2	0,0005		n.s.		0,00005	
PWM	19,9	0,005		0,05		0,00005	
PHA	16,8	0,00005		0,01		0,00005	

Tabelle 9: Statistische Signifikanz der Unterschiede in der Lyphozytenreaktivität auf Mitogene zwischen den 3 Gruppen des Normalprobandenkollektivs

Mitogene	Gruppe 1/2		Gruppe 1/3		Gruppe 2/3	
	F>	p<		p<		p<
Varidase	10,2	n.s.		0,01		0,01
Tetanustoxoid	14,4	0,005		n.s.		0,003
Diphtherietoxoid	7,9	0,05		0,05		0,03
Tuberkulin GT 1	12,4	n.s.		0,003		0,005
Tuberkulin GT 10	9,5	n.s.		0,03		0,01
Masernantigen	9,6	0,05		0,05		0,01
Vacciniaantigen	12,8	0,03		0,01		0,005
Rötelnantigen	8,0	n.s.		0,03		0,03
Antigencocktail	27,1	0,02		0,0005		0,0005

Tabelle 10: Statistische Signifikanz der Unterschiede in der Lyphozytenreaktivität auf Antigene zwischen den 3 Gruppen des Normalprobandenkollektivs

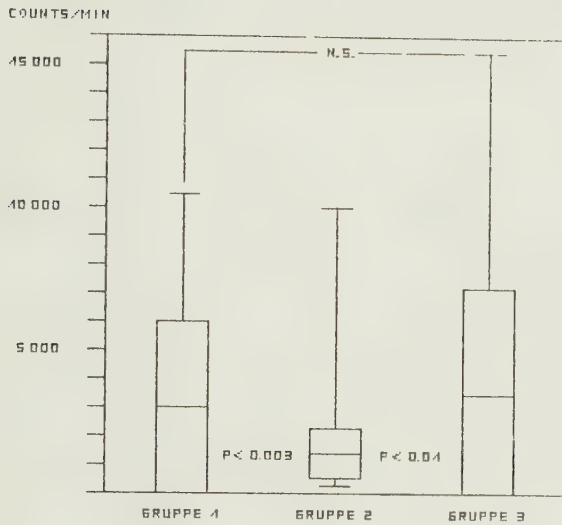


Abbildung 18: Lymphozytenreaktivität auf Protein A. Lymphozyten von Probanden der Gruppe 2 reagieren auf Protein A signifikant niedriger als die der beiden anderen Gruppen, die sich diesbezüglich nicht signifikant unterscheiden.

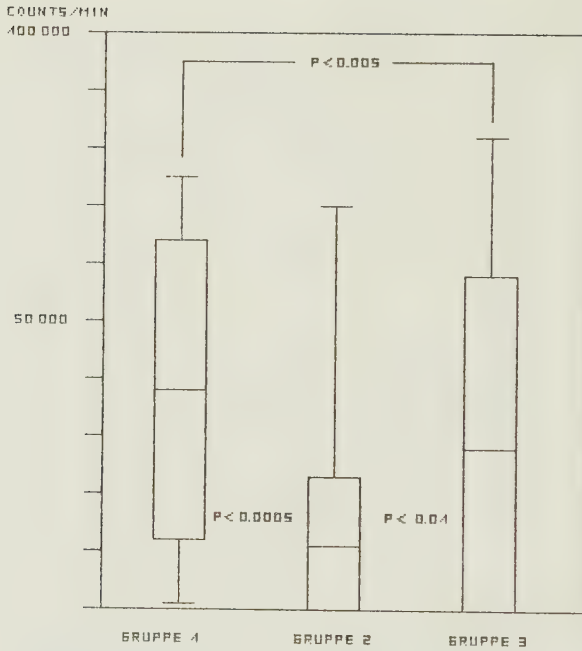


Abbildung 19: Lymphozytenreaktivität auf Concanavalin A (25 ul). Die Lymphozytenreaktivität auf Concanavalin A (25 ul) unterscheidet sich in den drei Gruppen signifikant, wobei die Reaktivität der Gruppe 2 am niedrigsten ist. Pw3;

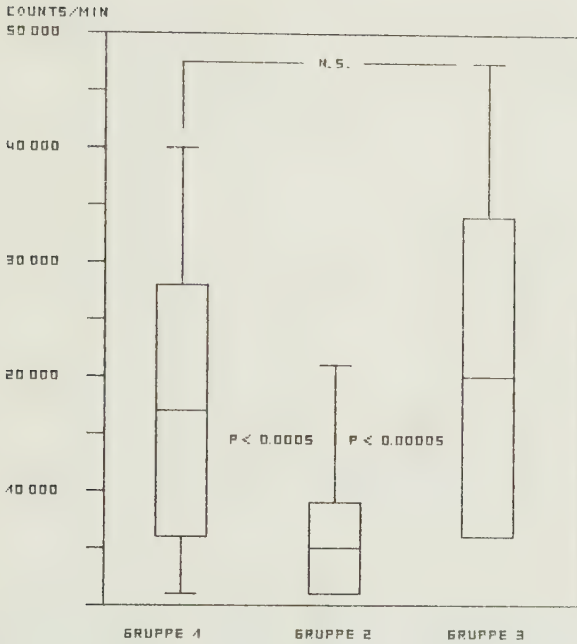


Abbildung 20: Lymphozytenreaktivität auf Concanavalin A (12,5 μ g).

Die Lymphozytenreaktivität von Probanden der Gruppe 2 ist signifikant niedriger als die der beiden anderen Gruppen, die sich bezüglich dieses Testsystems nicht unterscheiden.

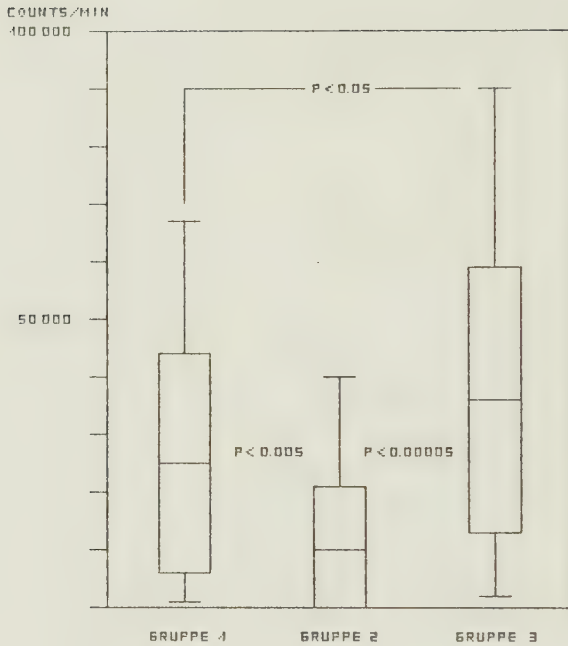


Abbildung 21: Lymphozytenreaktivität auf Pokeweed Mitogen. Die drei Gruppen unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Reaktivität auf Pokeweed Mitogen signifikant, die Reaktivität der Gruppe 3 ist am höchsten, die der Gruppe 2 am niedrigsten.

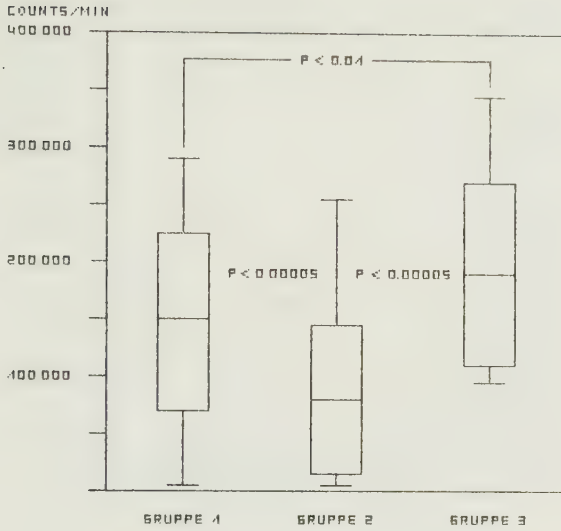


Abbildung 22: Lymphozytenreaktivität auf Phytohämagglutinin. Die drei Gruppen unterscheiden sich signifikant hinsichtlich ihrer Lymphozytenreaktivität auf Phytohämagglutinin. die Reaktivität der Gruppe 3 ist am höchsten, die der Gruppe 2 am niedrigsten.

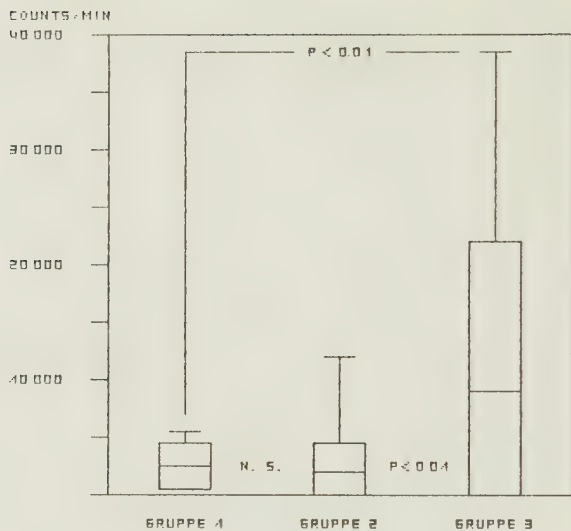


Abbildung 23: Lymphozytenreaktivität auf Varidase.
Die Lymphozytenreaktivität der Gruppe 3 auf Varidase ist signifikant höher als die der beiden anderen Gruppen, die sich diesbezüglich nicht signifikant voneinander unterscheiden.

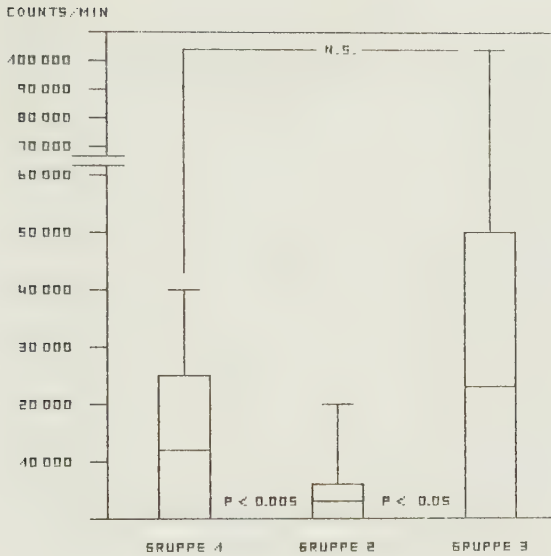


Abbildung 24: Lymphozytenreaktivität auf Tetanustoxoid.
Die Lymphozytenreaktivität der Gruppe 2 auf Tetanustoxoid ist signifikant niedriger als die der beiden anderen Gruppen, die sich diesbezüglich nicht voneinander unterscheiden.

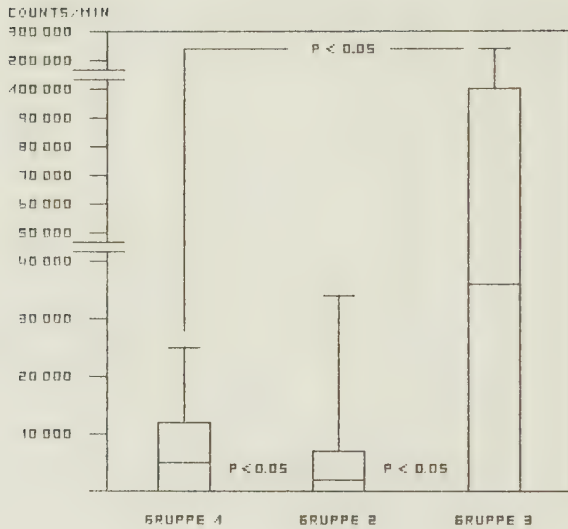


Abbildung 25: Lymphozytenreaktivität auf Diphterietoxoid. Die drei Gruppen unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Lymphozytenreaktivität auf Diphterietoxoid signifikant voneinander, wobei die Reaktivität der Gruppe 2 am niedrigsten, die der Gruppe 3 am höchsten ist.

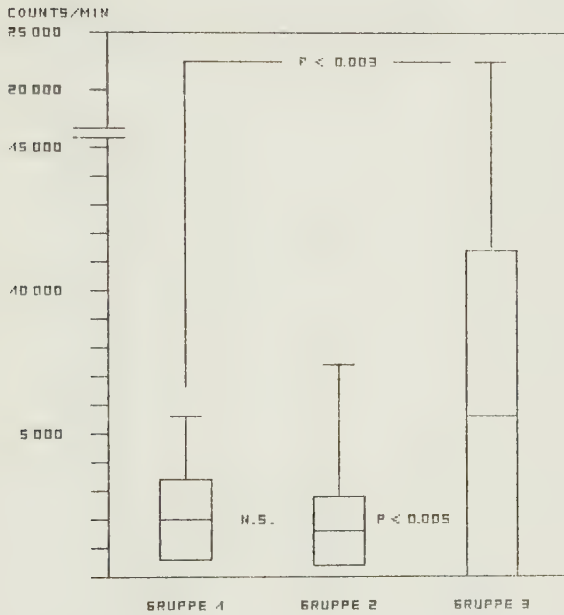


Abbildung 26: Lymphozytenreaktivität auf Tuberkulin GT 1. Die Lymphozytenreaktivität auf Tuberkulin 1 der Gruppe 3 ist signifikant höher als die der beiden anderen Gruppen, die sich diesbezüglich nicht unterscheiden.

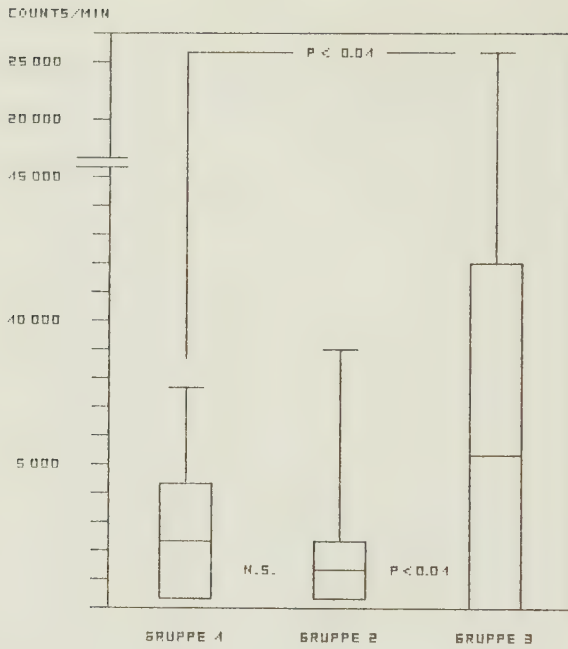


Abbildung 27: Lymphozytenreaktivität auf Tuberkulin GT 10. Die Lymphozytenreaktivität auf Tuberkulin GT 10 der Gruppe 3 ist signifikant höher als die der beiden anderen Gruppen, die sich diesbezüglich nicht unterscheiden.

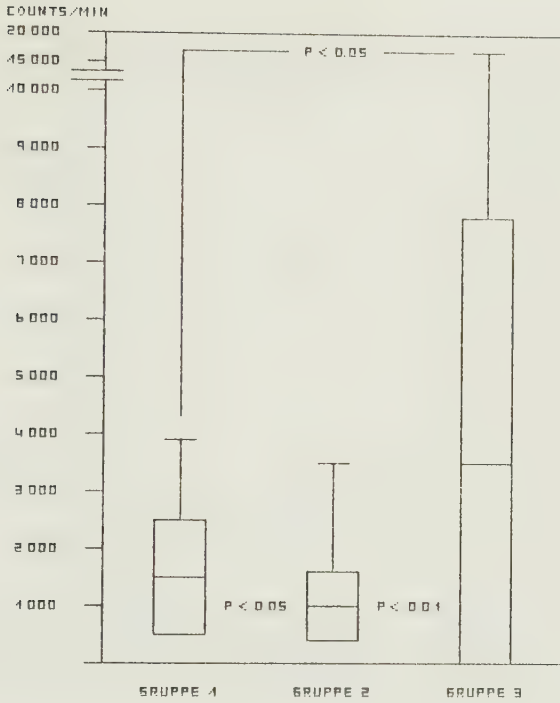


Abbildung 28: Lymphozytenreaktivität auf Masernantigen. Die drei Gruppen unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Reaktivität auf Masernantigen signifikant, wobei die Gruppe 2 am niedrigsten, die Gruppe 3 am höchsten reagiert.

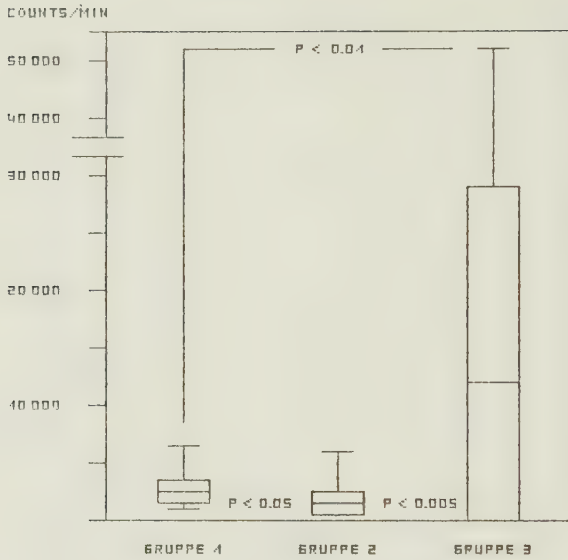


Abbildung 29: Lymphozytenreaktivität auf Vacciniaantigen. Die drei Gruppen unterscheiden sich in ihrer Reaktivität auf Vacciniaantigen signifikant, wobei die Gruppe 2 am niedrigsten, die Gruppe 3 am höchsten reagiert.

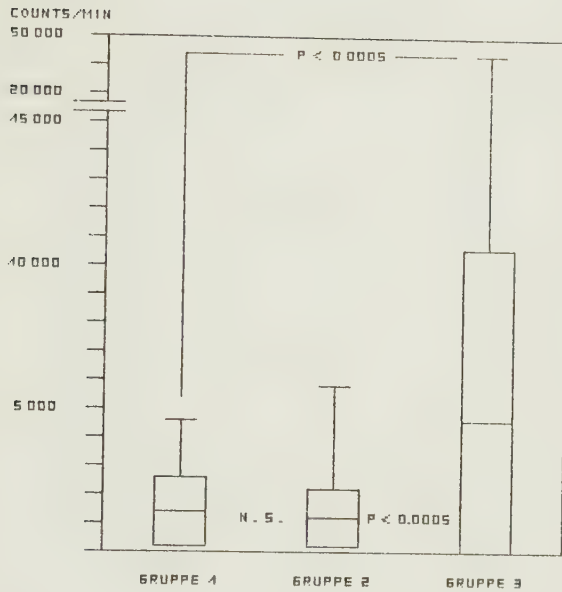


Abbildung 30: Lymphozytenreaktivität auf Rötelnantigen.
Die Lymphozytenreaktivität der Gruppe 3 ist signifikant höher als die der beiden anderen Gruppen, die sich diesbezüglich nicht signifikant voneinander unterscheiden.

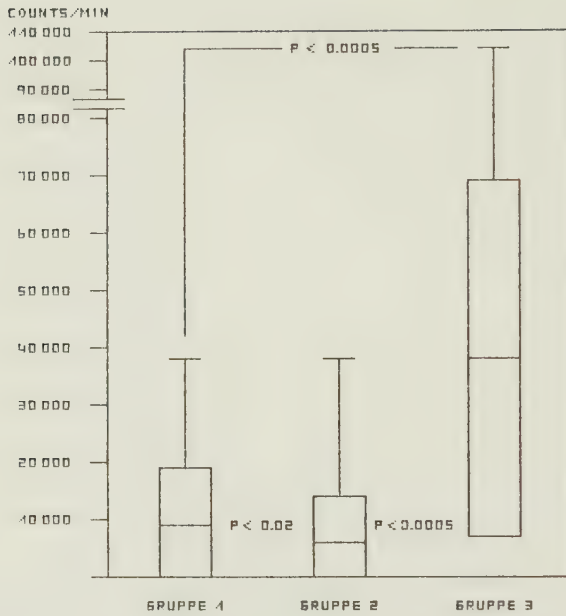


Abbildung 31 :Lymphozytenreaktivität gegen Antigencocktail. Die drei Gruppen unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Reaktivität auf Antigencocktail signifikant, wobei die Gruppe 2 am niedrigsten, die Gruppe 3 am höchsten reagiert.

Testsystem	Gruppe 1 (18)		Gruppe 2 (49)		Gruppe 3 (21)	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD
SpA	27	36	36	41	29	41
PWM	29	38	32	40	53	35
PHA	41	37	26	35	36	34
MLC	63	33	51	37	62	29

Tabelle 11: "Suppressorzellaktivität" (%) in den 3 Gruppen des Normalprobandenkollektivs: Es zeigt sich eine im wesentlichen identische "Suppressorzellaktivität"

Gruppe 1/2 Gruppe 1/3 Gruppe 2/3

Testsystem	F>	p<	p<	p<
SpA	0.5	n.s.	n.s.	n.s.
PWM	2.6	n.s.	n.s.	n.s.
PHA	1.6	n.s.	n.s.	n.s.
MLC	1.1	n.s.	n.s.	n.s.

Tabelle 12: Statistische Signifikanz der Unterschiede in der Suppressorzellaktivität zwischen den 3 Gruppen des Normalprobandenkollektivs: Es ergibt sich in keinem Testsystem ein statistisch signifikanter Unterschied.

	Gruppe 1 (18)		Gruppe 2 (49)		Gruppe 3 (21)	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD
T-Zellen, gesamt (OKT3)	45	16	43	13	38	17
T-Helferzellen (OKT 4)	28	13	27	8	22	13
T-Suppressor- und zytotoxische						
T-Zellen (OKT 8)	20	7	19	8	21	9
OKT 4/8	1.4	0.9	1.4	0.7	1.0	0.6

Tabelle 13: T-Zellsubfraktion (%) und OKT 4/8-Verhältnis in den 3 Gruppen des Normalprobandenkollektivs: Es zeigt sich im wesentlichen identische relative T-Zell und T-Zellsubfraktionskomponente.

Gruppe 1/2 Gruppe 1/3 Gruppe 2/3

F< p< p<

T-Zellen, gesamt

(OKT3) 0,15 n.s. n.s. n.s.

T-Helferzellen

(OKT 4) 0,54 n.s. n.s. n.s.

T-Suppressor- und
zytotoxische

T-Zellen (OKT 8) 1,00 n.s. n.s. n.s.

OKT 4/8 0,63 n.s. n.s. n.s.

Tabelle 14: Statistische Signifikanz der Unterschiede der relativen T-Zell- und T-Zellsubfraktionskompartimente zwischen den 3 Gruppen des Normalprobandenkollektivs: Es ergibt sich kein statistisch signifikanter Unterschied.

	Gruppe 1 (18)		Gruppe 2 (49)		Gruppe 3 (21)	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD
Lymphozyten	1976	491	2132	586	2279	621
T-Zellen	1092	378	1061	322	1027	465
T-Helferzellen	635	317	657	215	581	362
T-Suppressor- und zyto-						
toxische T-Zellen	476	178	479	189	554	277

Tabelle 15: T-Zellsubfraktionen (absolut/ul) in den 3 Gruppen des Normalprobandenkollektivs: Es zeigen sich im wesentlichen identische Zellzahlen/ul der T-Zellsubfraktionen.

	F>	Gruppe 1/2 p<	Gruppe 1/3 p<	Gruppe 2/3 p<
Lymphozyten	1,00	n.s.	n.s.	n.s.
T-Zellen	0,15	n.s.	n.s.	n.s.
T-Helferzellen	0,54	n.s.	n.s.	n.s.
T-Suppressor- und zytotoxische T-Zellen	1,00	n.s.	n.s.	n.s.

Tabelle 16: Statistische Signifikanz der Unterschiede der absoluten T-Zellzahlen zwischen den 3 Gruppen des Normalprobandenkollektivs: Es ergibt sich kein statistisch signifikanter Unterschied.

3.2.2 Histiocytose X

Unter 3.1.1 wurden die quantitativen Ergebnisse bei Patienten mit Histiocytose X mit dem gesamten Normalprobandenkollektiv verglichen.

Vergleicht man nun das Patientenkollektiv mit den einzelnen Clustern der Normalprobanden bezüglich der Ergebnisse bei der Mitogen- und Antigenstimulation, so stellt man fest, daß Patienten mit Histiocytose X vor Therapie mit Thymostimulin der Mittelhochreagentengruppe am ähnlichsten sind - sie stimmen in 11 von 14 Testsystemen mit dieser überein -, während die therapierten Patienten sich von der Hochreagentengruppe in nur einem von 14 Testsystemen unterscheiden, also diesem Kollektiv am ehesten zuzuordnen sind (Tab. 17).

Dieses Ergebnis wird durch die Clusteranalyse erhärtet, dergemäß alle untherapierten Patienten in den Kontrollcluster 1 (Mittelhochreagenten) fallen, alle mit Thymostimulin therapierten Patienten mit Histiocytose X aber in den Cluster 3 der Hochreagenten.

Die "Suppressorzellaktivität" der untherapierten Patienten unterscheidet sich von der der Hochreagentengruppe im PWM- und MLC-Ansatz, von der Niedrigreagentengruppe bezüglich MLC, PWM, SpA und von den Niedrigreagenten im MLC im MLC-Ansatz.

Nach Thymostimulingabe normalisiert sich die "Suppressorzellaktivität" und gleicht sowohl den einzelnen Clustern als auch der Kontrollgruppe als ganzer (siehe auch 3.1.2). Im PHA-Ansatz ist sie höher als die der Niedrigreagentengruppe (Tab. 18).

Vergleicht man nun noch die T-Zellsubfraktion des therapierten und untherapierten Patientenkollektivs mit den einzelnen Clustern der Normalprobanden, so sieht man, daß die vormals sowohl relativ als auch absolut erniedrigte Helferzellzahl unter der Therapie mit Thymostimulin ansteigt und sich dann nicht von der der einzelnen Gruppen unterscheidet (Tab. 19).

Die absolute T-Zellzahl ist bei Patienten mit Histiozytose X erniedrigt und zwar gegenüber allen Clustern, nach Thymostimulingabe normal (Tab. 20).

	HX/Gruppe 1		HX/Gruppe 2		HX/Gruppe 3	
	vor TH	nach TH	vor TH	nach TH	vor TH	nach TH
	p<	p<	p<	p<	p<	p<
Mitogene						
SpA	n.s.	n.s.	0,01	0,01	n.s.	n.s.
Con A (25 ug)	n.s.	n.s.	0,003	0,01	n.s.	n.s.
Con A (12,5 ug)	n.s.	0,05	0,03	0,03	n.s.	n.s.
PWM	n.s.	n.s.	0,01	0,05	n.s.	n.s.
PHA	0,05	0,05	n.s.	0,01	0,003	n.s.
Antigene						
Varidase	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	0,01	n.s.
Tetanustoxoid	n.s.	n.s.	0,03	0,01	0,01	n.s.
Diphtherietoxoid	0,05	n.s.	n.s.	0,05	0,03	n.s.
Tuberkulin GT 1	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	0,005	n.s.
Tuberkulin GT 10	n.s.	n.s.	0,05	0,05	0,03	n.s.
Masernantigen	n.s.	n.s.	n.s.	0,05	0,01	n.s.
Vacciniaantigen	n.s.	n.s.	n.s.	0,05	0,01	0,01
Rötelnantigen	0,05	n.s.	0,05	0,05	0,005	n.s.
Antigencocktail	n.s.	0,01	0,05	0,01	0,05	n.s.

Tabelle 17: Statistische Signifikanz der Unterschiede in der Lymphozytenreaktivität auf Mitogene und Antigene zwischen den 3 Gruppen des Normalprobandenkollektivs und den Patienten mit Histiozytose X (HX) vor und nach Therapie mit Thymostimulin (TH)

Testsystem	HX/Gruppe 1		HX/Gruppe 2		HX/Gruppe 3	
	vor TH	nach TH	vor TH	nach TH	vor TH	nach TH
	p<	p<	p<	p<	p<	p<
SpA	n.s.	n.s.	0,01	n.s.	n.s.	n.s.
PWM	n.s.	n.s.	0,05	n.s.	0,001	n.s.
PHA	n.s.	n.s.	n.s.	0,02	n.s.	n.s.
MLC	0,00005	n.s.	0,00005	n.s.	0,00005	n.s.

Tabelle 18: Statistische Signifikanz der Unterschiede der Suppressorzellaktivität zwischen den 3 Gruppen des Normalprobandenkollektivs und den Patienten mit Histiozytose X (HX) vor und nach Therapie mit Thymostimulin (TH)

	HX/Gruppe 1		HX/Gruppe 2		HX/Gruppe 3	
	vor TH	nach TH	vor TH	nach TH	vor TH	nach TH
	p<	p<	p<	p<	p<	p<
T-Zellen, gesamt (OKT3)	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
T-Helferzellen (OKT 4)	0,05	n.s.	0,05	n.s.	0,05	n.s.
T-Suppressor- und zytotoxische						
T-Zellen (OKT 8)	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
OKT 4/8	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Tabelle 19: Statistische Signifikanz der Unterschiede der relativen T-Zellsubfraktionen sowie des OKT 4/8-Verhältnisses zwischen den 3 Gruppen des Normalprobandenkollektivs und den Patienten mit Histiozytose X (HX) vor und nach Therapie mit Thymostimulin (TH)

	HX/Gruppe 1		HX/Gruppe 2		HX/Gruppe 3	
	vor TH	nach TH	vor TH	nach TH	vor TH	nach TH
	p<	p<	p<	p<	p<	p<
Lymphozyten	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
T-Zellen	0.02	n.s.	0.02	n.s.	0.05	n.s.
T-Helferzellen	0.003	n.s.	0.0005	n.s.	0.01	n.s.
T-Suppressor- und zytotoxische T-Zellen	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Tabelle 20: Statistische Signifikanz der Unterschiede der absoluten T-Zellsubfraktionen zwischen den 3 Gruppen des Normalprobandenkollektivs und den Patienten mit Histiozytose X (HX) vor und nach Therapie mit Thymostimulin (TH)

3.3 Verteilung der HLA-Gene

3.3.1 Normalprobandencluster

Die Ergebnisse der HLA-Genverteilung im gesamten Normalprobandenkollektiv zeigt Tabelle 21.

Für das Mittelhochreagentencluster 1 zeigen die Ergebnisse der HLA-Bestimmung an den B- und T-Zellen der Normalprobanden einen Trend zur Vermehrung der Gene A 28 ($rR = 2,8$), Aw 30/31 ($rR = 4,3$), B 12 ($rR = 2,0$), B 13 ($rR = 2,6$), B 27 ($rR = 2,0$), Bw 53 ($rR = 4,1$), Cw 2 ($rR = 4,0$), Cw 5 ($rR = 2,0$) und Cw 6 ($rR = 3,8$). Für die Gene Aw 30/31 und Bw 53 liegt eine statistische Signifikanz ($p < 0,05$) vor (Tab. 22).

Die Kombination wenigstens zweier dieser Gene mit $rR \geq 2$ bei einem Probanden findet sich im Cluster 1 in 33 % der Fälle ($rR = 12,0$), in Cluster 2 in 6 % der Fälle ($rR = 0,34$) und in Cluster 3 in keinem Fall ($rR = 0$). Diese nur als Trend zu bezeichnende Häufung dieser Genkombinationen ließ sich statistisch im Exakten Fischer Test untermauern ($p < 0,005$) und bleibt auch in der Yeates-Korrektur erhalten.

In der Reklassifikationsanalyse konnten 40 % der Angehörigen dieses Clusters aufgrund der bei ihnen gefundenen HLA-Genverteilung ihrer immunfunktionell definierten Gruppe richtig zugeordnet werden.

Die Probanden des Niedrigreagentenclusters 2 lassen einen Trend zur Vermehrung der Gene A 9 ($rR = 2,5$), B 14 ($rR = 4,4$), Bw 15 ($rR = 2,1$), Bw 16 ($rR = 7,0$), Bw 18 ($rR = 2,1$), Bw 22 ($rR = 2,5$) und Bw 37 ($rR = 2,5$) erkennen (Tab. 23).

Eine statistische Signifikanz liegt für das Gen Bw 16 vor ($p < 0,01$), diese Signifikanz bleibt auch in der Yeates-Korrektur erhalten.

Kombinationen wenigstens zweier dieser einen Trend zur Häufung zeigenden Gene sieht man in Cluster 2 in 20 % der Fälle ($rR = 9,7$), im Cluster 1 in 6 % der Fälle ($rR = 0,4$) und in Cluster 3 überhaupt nicht ($rR = 0$). Dieser Trend läßt sich mit einer Irr-

tumswahrscheinlichkeit von 0.03 statistisch abstützen.

In der Reklassifikationsanalyse konnten 50 % der Angehörigen des Niedrigreagentenclusters 2 aufgrund ihrer HLA-Genverteilung ihrer immunfunktionell definierten Gruppe richtig zugeordnet werden.

Im Hochreagentencluster 3 sind vermehrt die Gene B 5 ($rR = 3.2$), B 8 ($rR = 5.0$), B 13 ($rR = 2.1$), Bw 21 ($rR = 3.4$), Cw 1 ($rR = 3.4$) und Cw 7 ($rR = 3.3$) zu finden. Für die Gene B 5 ($p < 0.03$) und B 8 ($p < 0.05$) liegt auch eine statistische Signifikanz vor (Tab. 24).

Die Kombination aus wenigstens 2 dieser HLA-Gene findet man in Cluster 3 in 24 % der Fälle ($rR = 21.0$), in Cluster 1 und 2 überhaupt nicht. Die statistische Signifikanz für diesen Trend liegt bei $p < 0.005$.

In der Reklassifikationsanalyse konnten 70 % der Probanden des Hochreagentenclusters 3 aufgrund der bei ihnen gefundenen HLA-Genverteilung ihrer immunfunktionell definierten Gruppe richtig zugeordnet werden.

Es konnte kein Trend zum gehäuftem Auftreten eines bestimmten HLA-DR-Antigens in einer der 3 Kontrollgruppen gefunden werden.

3.3.2 Patienten mit Histiozytose X

Im Patientenkollektiv finden wir im HLA-System einen Trend zur Vermehrung der Gene A 9 ($rR = 2.6$), A 10 ($rR = 2.4$), B 14 ($rR = 2.4$), Bw 15 ($rR = 2.0$), Bw 21 ($rR = 15.5$), Cw 2 ($rR = 3.2$), Cw 6 ($rR = 7.6$) und Cw 7 ($rR = 10.8$) (Tab. 7a). Statistisch abstützen läßt sich dieser Trend für Bw 21 ($p < 0.01$), Cw 6 ($p < 0.03$) und Cw 7 ($p < 0.005$) und die Signifikanzen für Bw 21 und Cw 7 bleiben auch in der Yeates-Korrektur erhalten (Tab. 25).

Wenigstens 2 dieser Gene mit $rR \Rightarrow 2$ finden sich bei 40 % der Probanden des Patientenkollektivs, bei den Normalprobanden insgesamt nur in 8 % der Fälle.

In den einzelnen Clustern tritt die Kombination zweier dieser Gene in ungefähr gleicher Häufigkeit auf: Cluster 1 mit 11 %, Cluster 2 mit 8 % und Cluster 3 mit 5 %, so daß eine Zuordnung der Patienten mit Histiozytose X in eines dieser Cluster bezüglich der Genkombinationen nicht möglich ist.

Es fällt jedoch auf, daß die Gene, die einen deutlichen Trend zu Häufung bei den Patienten mit Histiozytose X zeigen (Bw 21: $rR = 15,5$, $p < 0,01$; Cw 7: $rR = 10,8$, $p < 0,005$) auch im Cluster 3 einen Trend zur Häufung zeigen (Bw 21: $rR = 3,4$, Cw 7: $rR = 3,3$). In Cluster 1 kommen die Gene Bw 21 und Cw 7 überhaupt nicht vor, in Cluster 2 tritt Bw 21 ebenfalls nicht auf und Cw 7 zeigt eine negative Assoziation ($rR = 0,8$) zu diesem Cluster.

Somit ist die Immungenetik der Patienten mit Histiozytose X der des Hochreagentenclusters 3 wohl am ähnlichsten.

A	1	25%	B	5	13%	Bw	21	1%	Cw	1	1%	Dr	1	17%
A	2	45%	B	7	26%	Bw	22	3%	Cw	2	3%	Dr	2	20%
A	3	32%	B	8	13%	B	27	3%	Cw	3	15%	Dr	3	25%
A	9	20%	B	12	23%	Bw	35	22%	Cw	4	17%	Dr	4	29%
A	10	7%	B	13	9%	Bw	37	3%	Cw	5	3%	Dr	5	35%
A	11	11%	B	14	7%	Bw	40	16%	Cw	6	2%	Dr	6	15%
A	26	6%	Bw	15	8%	Bw	53	1%	Cw	7	2%	Dr	7	23%
A	29	11%	Bw	16	9%	Bw	-	31%	Cw	-	95%	Dr	8	1%
Aw	30	5%	Bw	17	5%							Dr	-	32%
A	-	41%	Bw	18	8%									

Tabelle 21: Prozentuale Verteilung der HLA-Gene im Gesamtkontrollkollektiv

A	1	22%	0,8	B	8	11%	0,8	Bw	37	0%	0,0	Dr	1	10%	0,6
A	2	33%	0,5	B	12	33%	2,0	Bw	40	17%	1,1	Dr	2	10%	0,5
A	3	28%	0,5	B	13	17%	2,6	Bw	53	5%	4,1	Dr	3	36%	1,9
A	9	22%	1,1	B	14	6%	0,7	Bw	-	39%	1,6	Dr	4	20%	0,5
A	10	6%	0,8	Bw	15	6%	0,6	Cw	1	0%	0,0	Dr	5	40%	1,4
A	11	11%	1,0	Bw	16	0%	0,0	Cw	2	6%	4,0	Dr	6	10%	0,7
A	28	11%	2,8	Bw	17	6%	1,3	Cw	3	17%	1,2	Dr	7	20%	1,2
A	29	11%	1,6	Bw	18	6%	0,6	Cw	4	28%	1,7	Dr	8	0%	0,0
Aw	30	11%	4,3	Bw	21	0%	0,0	Cw	5	6%	2,0	Dr	-	50%	1,9
A	-	44%	1,2	Bw	22	0%	0,0	Cw	6	6%	3,8				
B	5	0%	0,0	B	27	6%	2,0	Cw	7	0%	0,0				
B	7	28%	1,1	Bw	35	22%	1,0	Cw	-	89%	1,1				

Tabelle 22: Prozentuale HLA-Genverteilung und relatives Risiko im Mittelhochreagenten-cluster 1 (n = 18)

A	1	22%	0,7	B	8	6%	0,2	Bw	37	6%	2,5	Dr	1	15%	0,8
A	2	49%	1,4	B	12	25%	1,2	Bw	40	14%	0,8	Dr	2	18%	1,0
A	3	35%	1,4	B	13	4%	0,2	Bw	53	0%	0,0	Dr	3	21%	0,7
A	9	27%	2,5	B	14	10%	4,4	Bw	-	29%	0,8	Dr	4	35%	1,5
A	10	9%	1,6	Bw	15	10%	2,1	Cw	1	0%	0,0	Dr	5	27%	0,5
A	11	11%	0,5	Bw	16	16%	7,0	Cw	2	4%	1,0	Dr	6	15%	0,9
A	28	4%	0,9	Bw	17	4%	0,8	Cw	3	12%	0,6	Dr	7	27%	1,5
A	29	8%	1,1	Bw	18	10%	2,1	Cw	4	25%	1,8	Dr	8	3%	0,8
A	30	2%	0,3	Bw	21	0%	0,0	Cw	5	2%	0,5	Dr	-	41%	2,0
A	-	37%	0,6	Bw	22	6%	2,5	Cw	6	2%	0,8				
A	5	12%	1,0	B	27	4%	1,6	Cw	7	2%	0,8				
A	7	25%	0,8	Bw	35	18%	0,7	Cw	-	97%	0,7				

Tabelle 23: Prozentuale HLA-Genverteilung und relatives Risiko im Niedrigreagenten-cluster 2 (n = 49)

1	33%	1.7	B	8	29%	5.0	Bw	37	0%	0.0	Dr	1	27%	1.9
2	48%	1.1	B	12	10%	0.3	Bw	40	19%	1.3	Dr	2	27%	1.6
3	29%	0.8	B	13	14%	2.1	Bw	53	0%	0.0	Dr	3	20%	0.7
9	5%	0.6	B	14	0%	0.0	B	-	29%	0.9	Dr	4	27%	0.9
10	5%	0.6	Bw	15	5%	0.5	Cw	1	5%	3.4	Dr	5	47%	1.8
11	19%	1.8	Bw	16	0%	0.0	Cw	2	0%	0.0	Dr	6	20%	1.3
28	5%	0.8	Bw	17	5%	1.1	Cw	3	19%	1.6	Dr	7	13%	0.5
29	5%	0.5	Bw	18	5%	0.5	Cw	4	5%	0.1	Dr	8	0%	0.0
30	5%	1.1	Bw	21	5%	3.4	Cw	5	5%	1.6	Dr	-	14%	0.3
A	48%	1.4	Bw	22	0%	0.0	Cw	6	0%	0.0				
B	24%	3.2	B	27	0%	0.0	Cw	7	5%	3.3				
B	29%	1.2	Bw	35	29%	1.7	Cw	-	95%	1.0				

Tabelle 24: Prozentuale HLA-Genverteilung und relatives Risiko im Hochreagenten-cluster 3 (n = 21)

A	1	24%	1,0	B	5	19%	1,8	Bw	21	14%	15,5	Cw	1	0%	0,0
A	2	57%	1,8	B	7	14%	0,5	Bw	22	5%	1,5	Cw	2	10%	3,2
A	3	24%	0,7	B	8	19%	1,8	B	27	0%	0,0	Cw	3	19%	1,4
A	9	38%	2,6	B	12	14%	2,4	Bw	35	0%	0,0	Cw	4	5%	0,2
A	10	14%	2,4	B	13	5%	0,5	Bw	37	5%	1,5	Cw	5	5%	1,5
A	11	0%	0,0	B	14	14%	2,4	Bw	40	19%	1,3	Cw	6	14%	7,6
A	28	0%	0,0	Bw	15	14%	2,0	Bw	53	0%	0,0	Cw	7	19%	10,8
A	29	10%	1,3	Bw	16	14%	1,8	B	-	24%	1,0	Cw	-	85%	0,3
Aw	30	0%	0,0	Bw	17	5%	1,1								
A	-	38%	1,0	Bw	18	10%	1,3								

Tabelle 25: Prozentuale Verteilung der HLA-Gene und relatives Risiko bei Patienten mit Histiozytose X (n = 20)

4 Diskussion der Ergebnisse

4.1 Vergleich der therapierten und untherapierten Patienten mit Histiozytose X mit dem Normalprobandenkollektiv im T-Test

Wie unter 3.1.1 ausführlich dargelegt, zeigte sich eine erhöhte Reaktivität der Lymphozyten von Patienten mit Histiozytose X auf mitogenen Reiz durch die Gabe von Thymostimulin. War die Reaktivität auf Con A 25 ug und SpA schon vor Therapie höher als die des Normalprobandenkollektivs, so gilt dies nach Therapie für alle verwendeten Mitogene.

Ähnlich verhält es sich mit der Antigenstimulation. Lagen hier vor Therapie die Ergebnisse für Rötelnantigen und Diphtherietoxid niedriger als die der Normalprobanden, so konnte nach Therapie kein signifikanter Unterschied in Bezug auf diese beiden Testsysteme festgestellt werden. Die Ergebnisse nach Stimulation der Patienten-Lymphozyten mit Tetanustoxoid und Antigencocktail liegen nach Therapie sogar in einem höheren Bereich als die Ergebnisse für die Lymphozyten des Normalprobandenkollektivs.

Wir konnten in 3 von 4 Testsystemen zeigen, daß die Concanavalin A-Blastenaktivität ("Suppressorzellaktivität") bei Patienten mit Histiozytose X erniedrigt ist und sich nach Gabe von Thymostimulin normalisiert.

Die relative wie die absolute T-Helferzellzahl ist im peripheren Blut von Patienten mit Histiozytose X erniedrigt und normalisiert sich nach Gabe von Thymostimulin, ebenso wie die gesamte T-Zellzahl.

Anhand dieses Systems immunfunktioneller Untersuchungen konnten wir also zeigen, daß Patienten mit Histiozytose X gewisse Defizite in ihrem Immunsystem aufweisen, insbesondere eine erniedrigte "Suppressorzellaktivität", die bereits von anderen Untersuchern gefordert wurde (123), und eine erniedrigte T-Helferzellzahl. Zudem konnten wir die meßbare Wirkung von Thymostimulin Typ 1 Serono[®] auf das Immunsystem nachweisen.

Da wir jedoch im Gegensatz zu anderen Untersuchern (123) keine Remissionen bei unseren Patienten beobachten konnten, stellt sich natürlich die Frage, ob die Thymostimulintherapie eine echte Alternative zu den bisherigen Therapieformen darstellt. Angesichts der wegen der Seltenheit der Erkrankung geringen Fallzahl läßt sich diese Frage jedoch nicht mit letzter Sicherheit beantworten.

Nun wird die Histiozytose X, über deren Pathogenese noch keine Klarheit herrscht, von den meisten Autoren als maligner Prozeß des Monozyten-Makrophagen-Systems angesehen (4, 32, 78, 104). Normale Gewebsmakrophagen wandeln sich unter dem Einfluß eines potentiell schädlichen Agens in die histopathologisch gut definierten Histiozytose X-Zellen um (9, 10, 31, 63, 164). Da eine Kontrolle der Makrophagen durch Lymphozyten, insbesondere durch T-Helfer- und Suppressorzellen, immer wieder diskutiert wird (149), wäre bei verminderter Zahl und/oder Aktivität derselben, eine gestörte Kontrolle durchaus denkbar (52).

Diese Histiozytose X-Zellen siedeln sich dann ungehindert und unkontrolliert beispielsweise im unteren Respirationstrakt an, wo sie den für die Histiozytose X charakteristischen Lungenbefall unterhalten.

Dabei wissen wir nicht, was zu der Verminderung der Aktivität der "Suppressorzellen" und der Zahl der Helferzellen geführt hat. In Betracht kämen Noxen, welcher Art auch immer, oder eine genetisch determinierte Variante der Immunreaktion, die zu den genannten Immundefekten prädisponiert.

Selbstverständlich darf man nicht übersehen, daß die Erniedrigung der Suppressor- und T-Helferzellen eine Reaktion auf das maligne Geschehen selbst sein kann. Die Erniedrigung der T-Helferzellen könnte eine Art Kompensationsmechanismus des Körpers darstellen, den malignen Prozeß einzudämmen, und die Erniedrigung der Suppressorzellaktivität dennoch ein Aufrechterhalten der immunologischen Abwehr gewährleisten. Dies würde auch erklären, warum die Lymphozyten der Patienten mit Histiozytose X bei erniedrigten

Helferzellzahlen auf mitogenen und antigenen Reiz in den meisten Testsystemen keine geringere Reaktion zeigen als die der Kontrollgruppe.

Erstere Hypothese, eine Lymphozytenfunktionsstörung als Ursache des malignen Prozesses, wird durch die Arbeit von Osband und Mitarbeitern (123) gestützt.

Diese bestimmten bei 17 Kindern mit bioptisch gesicherter, disseminierter Histiozytose X immunologische Aberrationen, die wir in unserer Untersuchung bestätigen konnten. Anschließend wurden sowohl die Patienten mit intramuskulären Injektionen von Thymostimulin behandelt als auch Testlymphozyten dieser Patienten mit Thymusextrakt inkubiert. Dabei konnte sowohl eine Normalisierung der immunologischen Parameter in 16 Fällen als auch eine klinische Remission in 10 Fällen gesehen werden.

Die parallel zur Normalisierung der Lymphozytenfunktion in vitro zu beobachtende klinische Remission könnte darauf hinweisen, daß eine Normalisierung der Lymphozytenfunktion das maligne Geschehen durchbrechen kann.

Obwohl wir im Gegensatz zu Osband keine Remissionen beobachten konnten - was aus der unterschiedlichen Zusammensetzung unseres Patientenkollektivs resultieren mag - rechtfertigen die Ergebnisse unserer Untersuchung eine größere kontrollierte Studie mit Thymusextrakt.

4.2 Ergebnisse der Clusteranalyse

In 3.2.1 haben wir gesehen, daß ein Kollektiv von gesunden Probanden kein einheitliches immunologisches Verhalten zeigt, sondern sich in 3 Gruppen, Cluster, einteilen läßt, die bezüglich ihrer Lymphozytenreaktivität auf proliferativen Reiz als Hoch- (Cluster 3), Niedrig- (Cluster 2) und Mittelhochreagenten (Cluster 1) bezeichnet werden können.

Die Gruppenzugehörigkeit der Probanden definiert sich dabei nicht anhand einzelner funktioneller Parameter, sondern über die Kon-

gruenz aller zwischen den Clustern differenten Parameter, d.h.: nicht über eine oder zwei, sondern über die Kongruenz aller getesteten und zwischen den Clustern differenten Größen, im konkreten Fall also über 14 Größen, nämlich alle getesteten Mitogene und Antigene. Dabei kann dann beispielsweise ein PHA - Hochreagent bei niedriger Immunantwort in allen anderen Systemen der Niedrigreagentengruppe 2 zugehören und ein PHA - Niedrigreagent der Hochreagentengruppe 3.

Die unterschiedliche Lymphozytenreaktivität der Angehörigen der verschiedenen Cluster auf mitogenen und antigenen Reiz ist somit wohl nicht Ausdruck der Reaktivität ihrer Lymphozyten auf ganz bestimmte Mitogene und Antigene als vielmehr Ausdruck der Reaktionsbereitschaft dieser Lymphozyten auf proliferativen Reiz im allgemeinen, und die ist in den 3 Kontrollgruppen gänzlich verschieden. Dabei unterscheidet sich die Hochreagentengruppe 3 deutlich stärker von den beiden anderen Gruppen als diese sich voneinander unterscheiden.

Da alle drei Kontrollcluster in allen getesteten Systemen gleiche Blutlymphozytenzahlen und gleiche relative wie absolute Anteile von T - Zellen und T - Zellsubfraktionen, und somit zwangsläufig gleiche T 4/8 - Verhältnisse, an den Lymphozyten des peripheren Blutes aufweisen und deshalb auch analoge B - Lymphozytenkompartimente aufweisen dürften, müßten diese beträchtlichen Reaktivitätsunterschiede eigentlich funktioneller Natur sein.

Nun erfordern derart erstaunliche Ergebnisse eine kritische Diskussion der Methode, mit der sie gewonnen wurden. Die Clusteranalyse ist ein Verfahren, das zur sogenannten "explorativen Datenanalyse" gezählt wird, und ist somit im Gegensatz zur klassischen "schließenden Statistik" ein vorwiegend beschreibendes Verfahren.

Die Überprüfung der in der Clusteranalyse gewonnenen Ergebnisse auf ihre statistische Validität erfordert also die Durchführung schließender statistischer Tests, wobei im gegebenen Fall der F - Test und der T - Test für ungleiche Stichproben ungleicher

Varianz zur Anwendung kamen.

Bei der Clusteranalyse selbst unterscheidet man das Clustering nach Fällen und das Clustering nach Merkmalen. In der vorliegenden Auswertung wurde die erstere Methode angewendet. Jeder unserer Fälle ist dabei durch eine definierte Menge ($n=26$) immunologischer Meßgrößen gekennzeichnet. Das Anliegen der Clusteranalyse besteht darin, anhand der vorliegenden immunologischen Befunde Ähnlichkeiten im immunologischen Muster bei den einzelnen Probanden festzustellen und sie nach rein heuristischen Kriterien in Cluster mit ähnlichen immunologischen Mustern einzuteilen.

Die Quantifizierung der Ähnlichkeit setzt voraus, daß zwischen den Probanden ein auf ihr immunologisches Wertemuster bezogener Abstand definiert wird. Bei der vorliegenden Analyse wurde als Ähnlichkeits - oder Abstandsmaß der sogenannte Rao-Abstand, der mit der inversen Kovarianzmatrix gewichtete euklidische Abstand zwischen den Meßwerten zweier Probanden benutzt und für jedes mögliche Probandenpaar berechnet. Dies ist zulässig und auch sinnvoll, da es sich bei allen unseren Meßwerten um quantitative Größen handelt.

Im Clusterverfahren kam dann ein sogenanntes "aufbauendes Clustering" zur Anwendung, was bedeutet, daß zunächst die zwei Probandenpaare ausgesucht wurden, bei denen der Abstand der immunologischen Wertemuster am kleinsten ist. Sie werden dann zu einem Cluster zusammengefaßt, dessen Kenngröße der Mittelwert der bei ihnen gefundenen Ergebnisse ist. In der Folge wird dann der Proband ausgesucht, dessen Abstand zu diesem Cluster minimal ist usw..

Das Auffinden von Gruppen als diesem schrittweisen "Amalgamationsprozeß" geschieht also rein heuristisch. Zu einer Gruppe werden diejenigen Fälle zusammengefaßt, die jeweils zum betreffenden Gruppenmittelwert einen geringen Abstand haben. Übersteigt dieser Abstand eine bestimmte Schwelle, werden die betreffenden Fälle zu einer neuen Gruppe zusammengefaßt. Die Festlegung des Schwellenabstands hängt weitgehend von den Charakteristiken der

Gruppen ab, und kann letztlich nur aufgrund der Daten getroffen werden. Dieses Vorgehen führte bei unseren gesunden Probanden zur Bildung der drei beschriebenen Cluster.

Nun stellt sich die Frage, welche Reproduzierbarkeit und Relevanz diesen Clustern zukommt. Diese Frage ist, wie ausgeführt, mit interferenzstatistischen Methoden zu klären, und hierbei wurde zunächst im F - Test geprüft, ob die Unterschiede zwischen den drei Clustermittelwerten im Vergleich zur Gesamtvariabilität statistisch signifikant sind. Dies ist, wie im Ergebnisteil gezeigt, für alle Mitogen- und Antigensysteme der Fall, dagegen überraschenderweise nicht für die "Suppressorzellaktivitäten" und die Lymphozytenfraktionen. Diese Signifikanzen wurden für jedes Einzeltestsystem im T - Test überprüft, was die gleichen Ergebnisse erbrachte. Als Gesamtergebnis beider Diskriminanzanalysen ergibt sich, daß statistisch hochsignifikante Unterschiede zwischen den 3 gefundenen Kontrollclustern bestehen. Die Angehörigen dieser 3 Gruppen können somit nicht mehr als homogen angesehen werden.

Gegen dieses Vorgehen könnte eingewendet werden, daß es sich um eine "interne Validierung" handelt, d.h., daß dieselben Probanden, die zur Clusterbildung beigetragen haben, nun auch zur Prüfung der Unterschiede herangezogen werden, und dieser Einwand ist im Prinzip berechtigt. Er läßt sich nur umgehen, wenn eine unabhängige Stichprobe existiert, an der diese Prüfung durchgeführt werden kann. Ist dies, wie bei einem Kollektiv Gesunder, nicht der Fall, bietet sich ein anderes Verfahren an, das generell unter dem Namen "Jack knife" - Methode bekannt ist. Dabei wird die Gesamtstichprobe zufällig in zwei Teile unterteilt. An dem einen Teil wird erneut die Clusteranalyse durchgeführt, und diese Ergebnisse werden dann mit den Daten der anderen Probanden in Diskriminanzanalysen validiert. Auch dieses Vorgehen wurde von uns durchgeführt.

Dabei konnten auch im Teilkollektiv dieselben drei Cluster gebildet werden, die sich hochsignifikant voneinander unterscheiden. Daraus läßt sich schließen, daß die Unterteilung unseres Gesamtkollektivs nicht willkürlich und zufällig erfolgte, sondern sich anhand einer unabhängigen Stichprobe auch bestätigen ließ. Daraus folgt, daß das gewählte Einteilungsverfahren reproduzierbar ist, und somit den gebildeten Clustern biologische Relevanz zukommt.

Es gibt also offensichtlich schon unter Gesunden wenigstens drei Gruppen, die immunfunktionell in hohem Maß different sind. Eine dieser Gruppen könnte dann durchaus als Risikokollektiv für die Erkrankung an Histiocyotose X in Betracht kommen (49, 50, 51).

Nun gehören alle Patienten mit Histiocyotose X in den Cluster 1 und sind somit Mittelhochreagenten auf mitogenen und antigenen Reiz. Da sich der Kontrollcluster 1 von den beiden anderen Kontrollclustern hinsichtlich der Lymphozytenreaktivität deutlich unterscheidet, gilt dies auch für die Patienten mit Histiocyotose X. Sie unterscheiden sich allerdings von den Angehörigen des Kontrollclusters 1 durch ihre niedrige "Suppressorzellaktivität", das bei normalen Blutlymphozytenzahlen sowohl relativ wie absolut erniedrigte T-Helferzellkompartiment und die wohl dadurch bedingte Erniedrigung der T-Zellzahl pro Mikroliter peripheren Blutes.

Nach Therapie mit Thymostimulin sind "Suppressorzellaktivität", relative wie absolute T-Helferzellkompartimentgröße und absolute T-Zellzahl pro Mikroliter peripheren Blutes normal. Mit der Normalisierung dieser Parameter einhergehend konnten wir, wie gezeigt, einen Anstieg der Lymphozytenreaktivität der behandelten Personen beobachten. Dieses ist durchaus einleuchtend, da ja bei erniedrigtem T-Helferzellkompartiment im peripheren Blut auch in den zahlenmäßig normierten Mitogen- und Antigenansätzen weniger T-Helferzellen vorhanden sein müssen, was eine im Vergleich zu Probanden mit normalem Helferzellanteil erniedrigte Lymphozytenreaktivität und deren Anstieg nach Normalisierung der Helfer-

zellzahl erklären würde.

Diese Befunde werden nun durch die Clusteranalyse nicht nur bestätigt, sondern erhärtet. Gehörten nämlich vor Therapie alle, auch die später behandelten Histiozytose-X-Patienten, dem Mittelhochreagentencluster 1 an und bildeten so eine nicht nur durch pathologisch-anatomische Kriterien definierte, sondern eine tatsächlich auch immunfunktionell homogene Gruppe, gehören die therapierten Patienten nach Thymostimulingabe und letztlich dadurch normalisierten Blutlymphozytenverhältnissen dem Hochreagentencluster 3 an. Dies erklärt einmal, daß ihre Lymphozytenreaktivität im einfachen direkten Vergleich (siehe 3.1) höher war, als die des heterogenen Gesamtkontrollkollektivs, da Histiozytose-X-Patienten mit normalen Blutlymphozytenverhältnissen eben homogen Hochreagenten sind, und bedeutet weiter, daß sie sich, dem Hochreagentencluster 3 zugehörend, immunfunktionell genau wie die Angehörigen dieses Clusters wesentlich stärker von den beiden anderen Clustern - wie auch von den untherapierten Patienten - unterscheiden, als die beiden anderen Cluster untereinander.

Da also die mittelhohe Lymphozytenreaktivität der Kranken mit hoher Wahrscheinlichkeit Ausdruck der bei der Histiozytose X bestehenden immunologischen Aberration ist, kommt für die Erkrankung der Hochreagentencluster 3 als wahrscheinlichstes Risikokollektiv in Betracht, dem die Kranken nach Normalisierung der Blutlymphozytenverhältnisse funktionell auch zugehören.

Diese Befunde würden die von Osband (123) aufgestellte und im klinischen Verlauf untermauerte Hypothese (siehe auch 4.1) weiter erhärten, wonach bei der Erkrankung bestehende Lymphozytenfunktionsstörungen über eine unzureichende Makrophagenkontrolle die Ursache für den - wahrscheinlich durch pathologischen Reiz ausgelösten (32) - malignen Prozeß des Monozyten-Makrophagen-Systems darstellen.

Inwieweit eine Therapie mit Thymostimulin oder dem von Osband eingesetzten Kalbsthymuspräparat wirklich eine Alternative zum bisherigen therapeutischen Vorgehen bei der Histiozytose X dar-

stellt, muß jedoch auch angesichts der Ergebnisse der Clusteranalyse wegen der kleinen Fallzahl und der bei unseren Patienten fehlenden Remissionen offen bleiben und bedarf der Bestätigung in größeren prospektiven und kontrollierten Studien.

Es kann aber aufgrund der vorliegenden Ergebnisse wohl als bewiesen gelten, daß das von uns eingesetzte Medikament Thymostimulin (Tp1 - Serono [®], Serono Freiburg) durchaus eine Wirkung auf das Immunsystem entfaltet, die über einen bloßen stimulatorischen Effekt hinausgeht und letztlich wohl über Immunmodulationsmechanismen erklärbar ist, deren funktionelle Abläufe allerdings unklar bleiben.

Bei kritischer Analyse muß man einräumen, daß diese Aussage allein über den einfachen direkten Vergleich von Gruppen nicht möglich ist und nur über das clusteranalytische Verfahren, das natürlich durch schließende statistische Verfahren zu überprüfen war, getroffen werden konnte. Dies unterstreicht die Bedeutung von Multivarianzanalysen, ihre Standardisierbarkeit und Reproduzierbarkeit, wie im konkreten Fall gegeben, vorausgesetzt, bei der Erhöhung der diagnostischen Aussagekraft immunologischer in-vitro-Tests.

Das von uns entwickelte multivariante Testsystem stellt somit eine durchaus brauchbare Methode dar, die Wirksamkeit von Medikamenten auf das Immunsystem zu überprüfen, was angesichts der des immer stärker umschgreifenden Einsatzes paramedizinischer, unter dem Etikett der immunologischen Wirksamkeit angepriesener Präparate in der Zukunft von Bedeutung sein könnte.

Kritisch anzumerken bleibt noch, daß die Lymphozyten des peripheren Blutes nur einen Teil des komplexen Immunsystems ausmachen (11), was die Aussagemöglichkeit unserer Ergebnisse natürlich begrenzt. Allgemein gelten Blutlymphozyten jedoch als brauchbares Modell bei dem Versuch, immunologische Prinzipien zu erhellen (106). Trotz dieser Einschränkung ist es möglich, bestimmte immunologische Krankheitsbilder durch Funktionsstörungen in vitro zu charakterisieren (47, 50, 52).

4.3 Diskussion HLA

Die unterschiedliche Vermehrung der nachgewiesenen Rezeptoren für HLA-Antigene, und somit Vermehrung der auf dem Chromosom Nr. 6 liegenden HLA-Gene, ließ sich durch das biologische Maß des relativen Risikos (rR) (≥ 2) zeigen. Wie schon aufgrund des Mißverhältnisses zwischen Probandenzahl und Heterogenität der HLA-Gene zu erwarten, konnte eine Vermehrung von HLA-Genen jedoch nur in wenigen Fällen auch statistisch belegt werden.

Für die verschiedenen Kombinationen jeweils 2 gehäuft auftretender Gene fanden wir auch statistisch belegbare unterschiedliche Häufigkeiten ($<0,05$) in den drei Kontrollclustern.

Allein aufgrund der HLA-Muster der Einzelprobanden gelang es, sie in 53 % der Fälle - und damit überzufällig häufig - "ihrem" Cluster zuzuordnen. (Nach dem Zufallsgesetz hätte dies nur in 33 % der Fälle erfolgen dürfen.) Für den Mittelhochreagentencluster allein gelang die Reklassifikation in 40 %, für den Niedrigreagentencluster in 50 % und für den Hochreagentencluster sogar in 70 % der Fälle. Somit wird eine unterschiedliche HLA-Genbesetzung der immunfunktionell differenten Cluster zumindest wahrscheinlich gemacht, wobei der Cluster 3 sich nun auch immungenetisch stärker von den beiden anderen Clustern zu unterscheiden scheint, als diese untereinander differieren.

Daraus darf die Hypothese abgeleitet werden, daß die unterschiedliche Reaktivität auf mitogenen und antigenen Reiz in den 3 Clustern in einer unterschiedlichen Genzusammensetzung des Haupthistokompatibilitätskomplexes wenigstens zum Teil begründet ist (52). Bei keinem der Cluster ließ sich eine biologisch signifikante Vermehrung eines HLA-DR-Gens feststellen. Offenbar kommt der Kombination der HLA-A, -B, und Cw-Gene eine größere Bedeutung für die Kodierung lymphozytärer Reaktionsbereitschaft zu als dem HLA-D/DR-Locus. Darauf weist auch das Phänomen der "high" und "low responder" in der MLC hin, wobei oftmals die Lymphozyten HLA-D-differenten Probanden weniger stark gegeneinander reagieren

als solche HLA-D-haploidentischer Personen (52, 114, 115). Was die Histiozytose X angeht, so sind die hier auftretenden Gen-Kombinationen in allen Clustern gleich häufig. Die Gene Cw 7 und Bw 21 jedoch zeigen hier eine auffallende Häufung und gleichzeitig im Kontrollcluster 3 einen Trend zur Vermehrung, während diese beiden Gene in den Clustern 2 und 3 nicht vorkommen, und das Gen Cw 7 zum Cluster 2 negativ assoziiert ist. Somit ist die Histiozytose X dem Hochreagentencluster 3, dem es nach Therapie mit Kälberthymusextrakt immunfunktionell angehört und der schon deshalb als Risikokollektiv für diese Erkrankung genannt wurde, wohl auch immungenetisch am ähnlichsten. Es muß betont werden, daß zum Beweis dieser Aussage eine Untersuchung mit erheblich größerem Stichprobenumfang nötig und sicherlich sinnvoll wäre.

5 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, anhand immunologischer In-vitro-Tests zu prüfen, ob das Krankheitsbild der Histiozytose X sich durch bestimmte immunologische Veränderungen charakterisieren läßt, und ob es in einem Kollektiv gesunder Probanden eine Untergruppe gibt, die als Risikogruppe für diese Erkrankung in Betracht kommt.

Blutlymphozyten von 88 gesunden Probanden und 20 Patienten mit Histiozytose X wurden durch 5 Mitogene und 9 Antigene stimuliert und die Blastopoese über 3H-Thymidineinbau gemessen. Es wurden die Blutlymphozytenzahlen, das T-Zellkompartiment und die T-Zellsubfraktionen bestimmt. Im Concanavalin A-Assay ("Suppressorzellassay") wurde in 3 Mitogensystemen und in der gemischten Lymphozytenkultur die Suppressorzellaktivität gemessen. Schließlich wurden auch die HLA-A-, B-, Cw-Antigene bei allen Probanden bestimmt, bei den Kontrollpersonen zusätzlich die HLA-DR-Antigene.

Über eine Clusteranalyse der University of California erfolgte die statistische Auswertung der Daten, die durch das sogenannte "Jack knife Verfahren" und in Diskriminanzanalysen in schließendem Verfahren überprüft wurde. Dabei erwies sich das Kontrollkollektiv als funktionell uneinheitlich und es konnten 3 Gruppen mit zwar numerisch gleichen Blutlymphozytenverhältnissen aber signifikant unterschiedlicher Reaktionsstärke auf Mitogene und Antigene unterschieden werden, wobei die der Gruppe 1 (n = 18) zugehörigen Probanden mittelhoch reagieren, die der Gruppe 2 (n = 49) niedrig und die der Gruppe 3 (n = 21) hoch.

Unter gesunden Probanden gibt es also wenigstens 3 Gruppen mit unterschiedlichem immunologischen Verhalten. Bei zahlenmäßig gleichen Blutlymphozytenverhältnissen müssen diese Unterschiede funktioneller Natur sein, wobei eines dieser immunfunktionell unterschiedlichen Cluster als Risikokollektiv für die Histiozytose X in Betracht kommt.

Die in der Clusteranalyse gefundenen, sich immunfunktionell signifikant unterscheidenden Gruppen zeigen jeweils einen Trend zur Vermehrung bestimmter HLA-A-, B-, Cw-Genkombinationen, während die HLA-DR-Gene sich gleichmäßig über alle Gruppen verteilen. Dies gibt einen Hinweis darauf, daß die unterschiedlich stark ausgeprägten Immunreaktionen innerhalb der einzelnen Gruppen genetisch determiniert sein dürften, wobei die Klasse-I-Antigene des Haupthistokompatibilitätskomplexes wohl eine gewisse Rolle spielen.

Lymphozyten von Patienten mit Histiozytose X unterscheiden sich von allen Kontrollen durch niedrige Aktivität der Concanavalin A-induzierten Blasten ("Suppressorzellen"), erniedrigtes T-Helferzellkompartiment und absolut erniedrigtes T-Zellkompartiment im peripheren Blut. Immunfunktionell gehören alle Patienten dem Mittelhochreagentencluster 1 an. Nach Behandlung mit Thymostimulin und damit verbundener Behebung der immunfunktionellen Defizite gehören alle behandelten Patienten dem Hochreagentencluster 3 an, welchem die Patienten auch immungenetisch am ähnlichsten sind. Somit kommt der Hochreagentencluster 3 als Risikokollektiv in Betracht.

Darüberhinaus konnte gezeigt werden, daß das angewendete Testsystem geeignet ist, die Wirkung von Medikamenten auf das Immunsystem zu überprüfen.

6 Literaturverzeichnis

1. Alper CA, Rosen FS: Genetics of the complement system. *Adv Human Genet* 7: 141 - 188 (1976)
2. Amos DB, Yunis EJ: A new interpretation of the major histocompatibility gene complexes of man and mouse. *Cell Immunol* 2: 515 - 520 (1972)
3. Anderson J, Möller G, Sjöberg O: B-lymphocytes can be stimulated by concanavalin A in the presence of humoral factors released by T-cells. *Eur J Immunol* 2: 99 - 101 (1971)
4. Auld D: Pathology of eosinophilic granuloma of the lung. *Arch Pathol* 63: 113 - 131 (1957)
5. Bach JF, Dardenne M: Studies on thymus products. II Demonstration and characterization of a circulating thymic hormone. *Immunology* 25: 353 - 366 (1973)
6. Bach MA, Bach JF: The use of monoclonal anti-T-cell antibodies to study T cell imbalances in human diseases. *Clin Exp Immunol* 45: 449 - 456 (1981)
7. Bain B, Vas MR, Lowenstein L: The development of large immature mononuclear cells in mixed leucocyte cultures. *Blood* 23: 108 - 116 (1964)
8. Bain B: Tritiated thymidine uptake in mixed leucocyte cultures: Effect of specific activity and exposure time. *J Clin Exp Immunol* 6: 255 - 262 (1970)
9. Basset F, Nexelof C: L'histiocytose X: Microscopie électronique: Culture "in vitro" et histioenzymologie: Discussion a propos des 21 cas. *Rev Fr Etudes Clin Biol* 14: 31 - 45 (1969)
10. Basset F, Corrin B, Spencer H: Pulmonary histiocytosis X. *Am Rev Respir Dis* 118: 811 - 820 (1978)
11. Begemann H, Rastetter J, Kaboth W: *Klinische Hämatologie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1975)

12. Begemann M: Das HLA-System des Menschen. Med Klinik 77: 436 - 445 (1982)
13. Behring E von: Die Werthbestimmung des Tetanustoxins und seine Verwendung in der menschenärztlichen und thierärztlichen Praxis. Dtsch Med Wschr 26: 29 - 32 (1900)
14. Behring E von, Kitashima: Über Verminderung und Steigerung der ererbten Giftempfindlichkeit. Berl Klin Wschr 38: 157 - 163 (1901)
15. Benecerraf B: Role of MHC gene products in immune regulation. Science 212: 1229 - 1238 (1981)
16. Bender K: Immunglobuline: I Genetik der Antikörperbildung. In: Handbuch der Humangenetik (Becker PE ed.). Band 1/3. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 223 - 243 (1975)
17. Bennink JR, Doherty PC: The response to H-2-different virus-infected cells is mediated by long-lived T-lymphocytes and is diminished by prior virus priming in a syngeneic enviroment. Cell Immunol 61: 220 - 224 (1981)
18. Bernhard W, Gramboulan N: Ultrastructure of immunologically competent cells. In: Cellular Aspects of Immunity. Ciba Foundation Symposium, Churchill, London: 92 - 121 (1960)
19. Bresnihan B, Jasin HE: Suppressor function of peripheral blood mononuclear cells in normal individuals and in patients with systemic lupus erythematosus. J Clin Invest 59: 106 - 116 (1977)
20. Brittinger G, König E, Cohnen G, Aberle HG: Lysosomale Enzyme in Lymphozyten. I Lymphoretikuläre Erkrankungen: Vergleich des Enzymgehalts (saure Phosphatase, Beta-Glucuronidase) unstimulierter Blutlymphozyten mit der Blastentransformation nach Phytohämagglutinin-Stimulierung in vitro. Acta Haemat 44: 205 - 251 (1970)

21. Brittinger G, König E, Aberle HG, Zimmerschitt E: Lysosomale Enzyme in Blutlymphozyten von Gesunden und Patienten mit chronischer Lymphadenose bei kurzdauernder unspezifischer Stimulation in vitro. Schweiz med Wschr 100: 341 - 344 (1970)
22. Brittinger G: Die Lymphozytenkultur als in vitro Modell immunologischer Vorgänge. In: Der Lymphozyt (Pietschmann H ed.). Verlag der Wiener medizinischen Akademie, Wien, 297 - 316 (1972)
23. Broff MD, Jonsen ME, Geha RS: Nature of the immunogenetic moiety recognized by human T cell proliferation in response to tetanus toxoid antigen. Eur J Immunol 11: 365 - 371 (1981)
24. Brown RS, Haynes HA, Foley HT, Godwin HA, Berard CW, Carbone PP: Hodgkin's disease. Immunologic, clinical and histologic features of 50 untreated patients. Ann Intern Med 67: 291 - 302 (1967)
25. Bundschuh G, Schneeweiß B: Immunologie. Akademie Verlag, Berlin (1976)
26. Cantor H, Simpson E: Regulation of the immune response by subclasses of T lymphocytes. I Interaction between pre-killer T cells and regulatory T cells obtained from peripheral lymphoid tissues of mice. Eur J Immunol 5: 330 - 336 (1975)
27. Cederbaum SD, Niwayama G, Stiehm ER, Neerhout RC, Amman AJ, Berman W jr: Combined immunodeficiency manifested by Letterer-Siwe syndrome. Lancet I 958 - 963 (1972)
28. Collins N, Collins NH: Major and minor histocompatibility systems of ectothermic vertebrates. In: The major histocompatibility system in man and animals (Götze D ed.). Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 313 - 337 (1977)
29. Cooper MD, Peterson RDA, South MA, Good RA: The function of the thymus system and the bursa system in the chicken. J Exp Med 123: 75 - 109 (1966)

30. Corrigal V: Lymphocyte studies in the rheumatoid arthritis. III A Comparative study of the responses of peripheral blood and synovial fluid lymphocytes to phytomitogens. *Scand J Rheumatol* 8: 10 - 16 (1979)
31. Corrin B, Basset F: A review of histiocytosis X with particular reference to eosinophilic granuloma of the lung. *Invest Cell Pathol* 2: 137 - 146 (1979)
32. Crystal RG, Bitterman PB, Rennard SI, Hance AJ, Keogh BA: Interstitial lung diseases of unknown cause. Disorders characterized by chronic inflammation of the lower respiratory tract (second of two parts). *New Engl J Med* 310: 235 - 244 (1984)
33. Dausset J, Hamberger J, Mathe G: Advances in transplantation. *Munksgaard, Copenhagen* (1966)
34. Dausset J: The major histocompatibility complex in man. Past, present and future concepts. *Science* 213: 1469 - 1474 (1981)
35. David JR: Lymphocyte mediators and cellular hypersensitivity. *New Engl J Med* 288: 143 - 149 (1973)
36. Davies AJS, Leuchars E, Wallis V, Koller PC: The mitotic response of thymus derived cells to antigenic stimulus. *Transplantation* 4: 438 - 451 (1966)
37. Davies AJS: Thymus and cellular basis of immunity. *Transplant Rev* 1: 43 - 91 (1969)
38. Day NK, Good RA: Biological amplification systems in immunology. *Plenum Press, New York* (1977)
39. DeVita VT jr: Lymphocyte reactivity in Hodgkin's disease. A lymphocyte civil war. *New Engl J Med* 289: 801 - 802 (1973)
40. De Vries RRP, Kreeftenberg HG, Loogen HG, Rood JJ van: In vitro immune responsiveness to vaccinia virus and HLA. *New Engl J Med* 297: 692 - 696 (1977)
41. Dickmeis E, Soeberg B, Svejegaard A: Human cell-mediated cytotoxicity against modified target cells is restricted by HLA. *Nature* 270: 526 - 528 (1977)

42. Dorr Burns F, Marrack PC, Kappler JW, Janeway CA: Functional heterogeneity among T-derived lymphocytes of the mouse. IV Nature of spontaneously induced suppressor cells. J Immunol 114: 1345 - 1347 (1975)
43. Eckstein R: Die zelluläre Immunität bei chronischer lymphatischer Leukämie und Lymphogranulomatose im Vergleich zu Normalpersonen - eine lymphozytenkinetische Untersuchung. Inauguraldissertation, München (1978)
44. Eckstein R, Mempel W, Bolte HD: Die Bedeutung niedriger Suppressorzellaktivität für die Pathogenese von Myokarditis und kongestiver Kardiomyopathie. Z Kardiol 70: 628 (1981)
45. Eckstein R, Mempel W, Bolte HD: Reduced suppressor cell activity in congestive cardiomyopathy and in myocarditis. Circ 65: 1224 - 1229 (1982)
46. Eckstein R, Mempel W, Heim MU, Bolte HD: Beziehungen zwischen HLA-Genen und niedriger Suppressorzellaktivität bei Patienten mit Myokarditis und kongestiver Kardiomyopathie. In: Forschungsergebnisse der Transfusionsmedizin und Immunhämatologie (Naef V, Stangel W eds.). Band 8, Medicus Verlag, Berlin: 559 - 566 (1983)
47. Eckstein R, Mempel W, Heim MU, Bolte HD: The role of human leukocyte antigen genes and low suppressor cell activity in the pathogenesis of myocarditis and dilated cardiomyopathy. In: Viral Heart Disease (Bolte HD ed.). Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 150 - 161 (1984)
48. Eckstein R, Bolte HD, Heim MU, Lehmeier A, Wilmanns W, Mempel W: Untersuchungen von T-Zellsubfraktionen bei Myokarditis und dilatativer Kardiomyopathie. Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für innere Medizin. Band 90. Bergmann Verlag, München, 1547 - 1550 (1984)

49. Eckstein R. Heim MU, Huhn D, Schneider B, Müller R, Peltz F, Mempel W: Clusters of healthy persons with different immune function and their relationship to genes of the major histocompatibility complex. Abstractbook "18th Congress of the International Society of Blood Transfusion", S. Karger Verlag, Basel, 155 (1984)
50. Eckstein R, Huhn D, Schneider B, Lehmeier A, Heim MU, Mempel W: Lymphozytenfunktionsstörungen bei Histiozytose X. In: Thymostimulin: Möglichkeiten bei der Behandlung sekundärer Immundefizienzen (Löhr G, Musil J eds.). Editio Cantor, Aulendorf, 78 - 87 (1984)
51. Eckstein R, Huhn D, Schneider B, Heim MU, Peltz F, Müller R, Edlmann M, Löhr G, Mempel W: Beeinflussung immunfunktioneller Parameter bei Histiozytose X durch Thymostimulin. *Arzneim Forsch* 35: 155 - 165 (1985)
52. Eckstein R: Immunologische in-vitro-Untersuchungen bei Gesunden und vier verschiedenen Krankheitsgruppen. Habilitationsschrift, München (1986)
53. Ellner JJ, Schacter BZ, Bhe FT: Tuberculin response of lymphocytes from human skin test non reactors; evidence for in vitro primary sensitization of T lymphocytes. *Cell Immunol* 45: 213 - 220 (1979)
54. Elves MW Gough J, Chapman JA, Israels MCP: Electron microscopy studies of lymphocytes. *Lancet* I: 306 - 308 (1964)
55. Elves MW: The lymphocytes. Lloyd Luke, London (1966)
56. Farber S: The nature of solitary or eosinophilic granuloma of bone. *Am J Pathol* 17: 625 - 629 (1941)
57. Fink U: Die Rosettenformationen - ein Marker thymusabhängiger Lymphozyten beim Menschen. Habilitationsschrift, München (1975)
58. Folsch H, Waksman BH: Regulation of lymphocyte responses in vitro. V Suppressor activity of adherent and nonadherent rat lymphoid cells. *Cell Immunol* 9: 12 - 24 (1973)

59. Forsgren A, Sjöquist J: "Protein A" from *S. aureus*: I Pseudoimmune reaction with human gammaglobulin. *J Immunol* 97: 822 - 827 (1966)
60. Forsgren A, Svedjelund A, Wigzell H: Lymphocyte stimulation by Protein A of *staphylococcus aureus*. *Eur J Immunol* 6: 207 - 213 (1976)
61. Fowles RE, Bieber CP, Stinson EB: Defective in vitro suppressor cell function in idiopathic congestive cardiomyopathy. *Circulation* 59: 483 - 491 (1979)
62. Franck U, Pellegrino MA: Assignment of the major histocompatibility complex to a region of the short arm of human chromosome 6. *Proc Nat Acad Sci USA* 74: 1147 - 1151 (1977)
63. Friedman PJ, Liebow AA, Sokolow J: Eosinophilic granuloma of lung: clinical aspects of primary pulmonary histiocytosis in the adult. *Medicine* 6: 385 - 396 (1981)
64. Fu SM, Winchester RJ, Kunkel HG: Occurrence of surface IgM, IgD, and free light chains of human lymphocytes. *J exp Med* 139: 451 - 456 (1974)
65. Fudenberg HH: Genetically determined immune deficiency as the predisposing cause of "autoimmunity" and lymphoid neoplasia. *Am J Med* 51: 295 - 298 (1971)
66. Fudenberg HH, Stites DP, Caldwell JL, Wells JV (eds.): Basic and clinical immunology. Lange Medical Publications, Los Altos, California (1978)
67. Geha RS, Rosen FS, Merler E: Unresponsiveness of human B lymphocytes to phytohaemagglutinin. *Nature* 248: 426 - 428 (1974)
68. Geraldles A: Effect of interferon on cells, viruses and the immune system. Academic Press, New York (1975)
69. Gershon RK, Kondo K: Cell interactions in the induction of tolerance: The role of thymic lymphocytes. *Immunol* 18: 723 - 738 (1970)

70. Gershon RK, Gery J, Waksman BH: Suppressive effects of in vivo immunization on PHA responses in vitro. *J Immunol* 112: 215 - 221 (1974)
71. Glick B, Chang TG, Jaap RG: The bursa of Fabricius and antibody production. *Poultry Sci* 35: 224 - 225 (1956)
72. Gotoff SP, Esterly NB: Histiocytosis. *J Pediatr* 85: 592 - 594 (1974)
73. Goudie RB, Macfarlane BS, Lindsay MK: Homing of lymphocytes to nonlymphoid tissues. *Lancet* 1: 292 - 293 (1974)
74. Gowans JL, Mc Gregor DD: The immunological activities of lymphocytes. *Progr Allergy* 9: 1 - 78 (1965)
75. Gowen JW: Genetic effects in non-specific resistance to infectious disease. *Bacteriol Rev* 24: 192 - 200 (1960)
76. Greaves MF, Hogg NM: Immunoglobulin determinants on the surface of antigen binding T- and B-lymphocytes in mice. In: *Progress in Immunology* (Amos B ed.). Academic Press, New York, 111 - 126 (1971)
77. Greaves MF, Owen JJT, Raff MC: T and B lymphocytes. *Excerpta Medica*, Amsterdam (1973)
78. Groopman JE, Golde DW: The histiocytic disorder: a pathophysiological analysis. *Ann Intern Med* 94: 95 - 107 (1981)
79. Halim K, Wong DM, Mittal KK: The HLA typing of human spermatozoa by two color fluorescence. *Tissue Antigens* 19: 90 - 91 (1982)
80. Hapel AJ, Bablanian R, Cole GA: Inductive requirements for the generation of virus-specific T lymphocytes. I The nature of the host cell-virus interaction that triggers secondary poxvirus-specific cytotoxic T lymphocyte induction. *J Immunol* 121: 736 - 743 (1978)
81. Hardin JA, Chused TM, Steinberg AD: Suppressor cells in the graft versus host reaction. *J Immunol* 111: 650 - 651 (1973)
82. Havemann K, Rubin AD: The delayed response of chronic lymphocytic leukemia lymphocytes to phythaemagglutinin in vitro. *Proc Soc Exp Biol Med* 127: 668 - 671 (1968)

83. Havemann K, Schmidt M: Lymphozytenkulturen bei Hodgkinscher Erkrankung. Hinweise auf zwei Lymphozytenpopulationen bei unterschiedlicher Reaktion auf Phytohämagglutinin. Klin Wschr 46: 31 - 33 (1968)
84. Herbermann RB: Lymphoid cells in immune surveillance against malignant transformation. In: Advances in Host Defence Mechanisms (Gallin JI, Fauci AS eds.). Volume 2. Raven Press, New York: 241 - 273 (1983)
85. Hirschhorn K, Bach F, Kolodny RL, Firschein IL, Hashem N: Immune response and mitosis of human peripheral blood lymphocytes in vitro. Science 142: 1185 - 1187 (1963)
86. Hodes RJ, Hathcock KS: In vitro generation of suppressor cell activity: Suppression of in vitro induction of cell mediated cytotoxicity. J Immunol 116: 167 - 177 (1976)
87. Hodgson HJF, Wands JR, Isselbacher KJ: Alteration in suppressor cell activity in chronic active hepatitis. Proc Nat Acad Sci USA 75: 1549 - 1553 (1978)
88. Huber H, Pathouli Ch, Michlmayr G: Immunpathologie lymphatischer Systemerkrankungen. In: Lymphozyt und klinische Immunologie (Thiel H, Begemann H eds.). Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York: 96 - 11 (1975)
89. Huhn D: Über das Ergastoplasma von Lymphozyten des peripheren Blutes. Dtsch med Wschr 93: 355 - 356 (1968)
90. Humphrey JH, White RG: Immunology for students of medicine. Blackwell Scientific Publications, Oxford (1970)
91. Ivani K, Murgatroyd LB, Lydgard PM: Bursal origin of bone marrow cells with competence for antibody formation. Immunology 23: 107 - 111 (1972)
92. Jaffe HL, Lichtenstein L: Eosinophilic granuloma of bone: a condition affecting one several or many bones but apparently limited to the skeleton, and representing the mildest clinical expression of the peculiar inflammatory histiocytosis also underlying Letterer-Siwe disease and Schüller Christian disease. Arch Pathol 37: 99 - 118 (1949)

93. Jones KD: Lymphocyte response to PHA and patient response to chemotherapy in breast cancer. Clin Oncol 6: 159 - 166 (1980)
94. Kato S, Muranska S, Takakura I, Kimura M, Tsuji K: HLA-Dr antigens and the rubella-specific immune response in man. Tissue Antigens 19: 140 - 145 (1982)
95. Keller R: Immunologie und Immunpathologie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1977)
96. Kissmeyer-Nielsen F, Kjerbye E: Lymphocytotoxic microtechnique. Purification of lymphocytes by flotation. Histocompatibility testing 1967. Munksgaard, Kopenhagen: 381 - 383 (1967)
97. Kissmeyer-Nielsen F, Svejegaard A, Freiesleben-Sorensen S, Staub-Nielsen L, Thoresby E: Mixed lymphocyte cultures and HLA-identity in unrelated subjects. Nature 228: 63 - 65 (1970)
98. Klein J: Evolution and function of the major histocompatibility system: facts and speculations. In: The Major Histocompatibility System in Man and Animals (Götze D ed.). Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York: 339 - 378 (1977)
99. Koszinowski U, Ertl H: Lysis mediated by T cells and restricted by H-2 antigen of target cells infected with vaccinia virus. Nature 255: 552 - 554 (1975)
100. Kung BC, Goldstein G, Reinherz EL, Schlossmann SF: Monoclonal antibodies defining distinctive human T cell surface antigens. Science 106: 347 - 349 (1979)
101. Lachmann PJ: Lymphocyte cooperation. Proc Roy Soc. Band 176, London: 425 - 426 (1971)
102. Landsteiner K: Über Agglutinationserscheinungen normaler menschlicher Blute. Wien klin Wschr 14: 1132 - 1134 (1901)
103. Lamm LU, Svejegaard A, Kissmeyer-Nielsen F: PGM 3: HLA is another linkage in man. Nature (New Biology) 231: 109 - 110 (1971)

104. Lichtenstein L: Histiocytosis X: integration of eosinophilic granuloma of bone. "Letterer-Siwe" disease and "Schüller-Christian" disease as related manifestations of a single nosologic entity. Arch Pathol 56: 84 - 102 (1953)
105. Lin SP, Cooper AG, Wortis HH: Scanning electron microscopy of human T cells and B cell rosettes. New Engl J Med 289: 548 - 551 (1973)
106. Loor F, Roelants GE: B and T cells in immune recognition. John Wiley and Sons, Chichester (1977)
107. Macdonald TT: Immunsuppression caused by antigen feeding. II Suppressor cells mark Peyer's path B-cell priming to orally administred antigen. Eur J Immunol 13: 138 - 142 (1983)
108. Matchett KM, Huang AT, Kremer WB: Impaired lymphocyte transformation in Hodgkins's disease. Evidence for depletion of circulating T-lymphocytes. J Clin Invest 52: 1908 - 1917 (1973)
109. Mauer AM, Lampkin BC, Mc Williams NB: Reticuloendotheliosis. In: Hematology of Infancy and Childhood (Nathan DG, Oski FA eds.). WB Saunders, Philadelphia, 710 - 715 (1974)
110. Mc Michael A, Sasazuki T, Mc Devitt HO: The immune response to diphtheria toxoid in humans. Transplant Proc 9: 191 - 194 (1977)
111. Mc Michael A, Ting A, Zweerink HJ, Asconas BA: HLA restriction of cell mediated lysis of influenza virus infected human cells. Nature 270: 524 - 526 (1977)
112. Medawar PB, Simpson E: Thymus-dependent lymphocytes. Nature 258: 106 - 108 (1975)
113. Mempel W, Albert E, Burger A: Further evidence for a sepe-rate MLC-locus. Tissue Antigens 2: 250 - 254 (1972)

114. Mempel W, Grosse-Wilde H, Baumann P, Netzel B, Steinbauer-Rosenthal I, Scholz S, Bertrams J, Albert A: Population genetics of the MLC response: Typing for MLC determinants using homozygous and heterozygous reference cells. Transplant Proc 5: 1529 - 1538 (1973)
115. Mempel W, Grosse-Wilde H, Albert E, Thierfelder S: Atypical MLC reactions in HLA typed related and unrelated pairs. Transplant Proc 5: 401 - 409 (1973)
116. Mizerski J, Chartrand S, Gajlpeczalska K: Con-A-induced suppressor cells in man. I Induction and characterization of suppressor cells. Immunobiol 158: 270 - 281 (1981)
117. Möller G, Svehaug SE: Specificity of lymphocyte-mediated cytotoxicity induced by in vitro antibody-coated target cells. Cell Immunol 4: 1 - 9 (1972)
118. Munro A, Bright S: Products of the major histocompatibility complex and their relationship to the immune response. Nature 264: 145 - 152 (1976)
119. Munro A, Waldmann H: Major histocompatibility system and immune response. Brit Med Bull 34: 253 - 258 (1978)
120. Nelson DS: Macrophages and Immunity. North Holland Publ, Amsterdam (1968)
121. Nowell PC: Phytohemagglutinin: An initiator of mitosis in cultures of normal human leukocytes. Cancer Res 20: 462 - 467 (1960)
122. Oie M, Ichihashi Y: Target antigen of vaccinia-infected cells recognized by virus-specific cytotoxic T lymphocytes. Immunol 25: 361 - 375 (1981)
123. Osband ME, Lipton JM, Lavin P, Levey R, Vawter G, Greenberger JS, McCaffrey R, Parkman R: Histiocytosis-X: Demonstration of abnormal immunity, T-cell histamine H2-receptor deficiency and successful treatment with thymic extract. New Engl J Med 304: 146 - 153 (1981)
124. Osler AC: Complement: Mechanisms and functions. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, New York (1976)

125. Owen JJT, Ritter MA: Tissue interaction in the development of thymus lymphocytes. *J exp Med* 129: 431 - 442 (1969)
126. Pachmann K, Pachmann U, Penning R: Allocation of the suppressive activity of normal peripheral blood lymphocytes induced by diffusion chamber culture and Con A Stimulation to the G2 phase of the cell cycle. *Cell Immunol* 94: 21 - 31 (1985)
127. Pappenheim A: Panoptische Universalfärbung für Blutpräparate. *Med Klin* 32: 1244 (1908)
128. Parkhouse RME, Abney ER: Heterogeneity of surface immunoglobulin on murine B-lymphocytes. In: *Membrane Receptors of Lymphocytes* (Seligman M, Preud'homme JL, Kourilsky FM eds.). North-Holland Publ. Amsterdam: 51 - 64 (1975)
129. Parkinson T: Eosinophilic xanthomatous granuloma with honeycomb lungs. *Br Med J* 1: 1029 - 1030 (1949)
130. Parrot DMV, De Sousa MAB: Thymus dependent and thymus independent populations: origin, migratory patterns and lifespan. *Clin exp Immunol* 8: 663 - 684 (1971)
131. Pasquier L Du: Phylogenesis of the vertebrate immune system. In: *The immune system* (Melchers F, Rajewski K eds.). Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York: 101 - 115 (1977)
132. Peavy DL, Pierce CW: Cell-mediated immune responses in vitro. I Suppression of the generation of cytotoxic lymphocytes by concanavalin A-activated spleen cells. *J exp Med* 140: 356 - 369 (1974)
133. Pellegrino MA, Ferrone S, Safford JW jr, Hirata AA, Terasaki PI, Reisfeld RA: Stimulation of lymphocyte transformation by streptococcal type M 1 protein: relationship to HLA antigens. *J Immunol* 109: 97 - 109 (1972)
134. Penn I: Depressed immunity and the developement of cancer. *Clin exp Immunol* 46: 459 - 474 (1981)

135. Perlman P, Nilsson H, Leon MA: Inhibition of cytotoxicity of lymphocytes by concanavalin A in vitro. *Science* 168, 1112 - 1115 (1970)
136. Peter HH: The origin of human NK cells. An ontogenetic model derived from studies in patients with immunodeficiencies. *Blut* 46: 239 - 248 (1983)
137. Piquet PF, Vassalli P: Study of the thymic-derived or - independent nature of mouse spleen cells induced to proliferate in culture by various mitogens and antigens. *Eur J Immunol* 3: 447 - 483 (1973)
138. Plaut M, Lichtenstein LM, Henney CS: Properties of a subpopulation of T cells bearing histamin receptors. *J Clin Invest* 55: 856 - 874 (1975)
139. Playfair JHL, Purves EC: Separate thymus dependent and thymus independent antibody forming cell precursors. *Nature* 213: 149 - 151 (1971)
140. Polliak A, Lampen N, Clarkson BD, De Harven E, Bentwich Z, Kunkel HG: Identification of human B and T lymphocytes by scanning electron microscopy. *J exp Med* 138: 607 - 624 (1973)
141. Rabellino E, Grey HM: Immunoglobulins on the surface of lymphocytes. III Bursal origin of surface immunoglobulins on chicken lymphocytes. *J Immunol* 106: 1418 - 1420 (1971)
142. Raeman F, De Cock W, De Beukelaar T, De Cree J, Verhaegen H: Enumeration of T lymphocyte subsets in autoimmune disease using monoclonal antibodies. *Clin Exp Immunol* 45: 475 - 479 (1981)
143. Raff MC, Cantor H: Subpopulations of thymus cells and thymus-derived lymphocytes. In: *Progress in Immunology* (Amos B ed.). Academic Press, New York: 83 - 93 (1971)
144. Rappaport H: Tumors of the hemopoietic system. *Atlas of tumor pathology, Section III, Fascicle 8*. Armed Forces Institute of Pathology, Washington DC (1966)

145. Reinherz EL, Moretta L, Roper M, Breard JM, Mingari MC, Cooper MD, Schlossmann SF: Human T-lymphocyte subpopulations defined by Fc receptors and monoclonal antibodies. A comparison. *J exp Med* 151: 969 - 974 (1980)
146. Reinherz EL, Schlossmann SF: The differentiation and function of human T-lymphocytes. *Cell* 19: 821 - 827 (1980)
147. Rich R, Rich S: Biological expression of lymphocyte activation: IV Concanavalin A-activated suppressor cells in mouse mixed lymphocyte reactions. *J Immunol* 114: 1112 - 1115 (1975)
148. Rigas DA, Osgood EE: Purification and properties of the phytohemagglutinin of *Phaseolus vulgaris*. *J Biol Chem* 212: 607 - 609 (1956)
149. Roelants GE: The regulatory role of macrophages in immune recognition. In: B and T cells in immune recognition (Loor F, Roelants GE eds.). John Wiley and Sons, Chichester: 103 - 125 (1978)
150. Roszkowska W, Plaut M, Lichtenstein LM: Selective display of histamine receptors on lymphocytes. *Science* 195: 683 - 685 (1977)
151. Rowe DS, Hug K, Forni L, Pernis B: Immunoglobulin D as a lymphocyte receptor. *J exp Med* 138: 965 - 972 (1973)
152. Rowley D: Phagocytosis. *Adv Immunol* 2: 241 - 264 (1962)
153. Rubin AD, Johnson LI, Brown SM: Lymphocyte proliferation and lymphoproliferative disorders. *Prog exp Tumor Res* 13: 135 - 180 (1970)
154. Ruckdeschl JC, Graziano KD, Mardiney MR jr: Additional evidence that the cell-associated immune system is the primary host defense against measles (rubeola). *Cell Immunol* 17: 11 - 18 (1975)
155. Rustad RC: Pinocytosis. *Sci Amer* 204: 120 - 130 (1961)
156. Salton MRJ: The properties of lysozyme and its action on microorganisms. *Bacteriol Rev* 21: 82 - 130 (1957)

157. Sasazuki T, Kohno Y, Iwamoto I, Tanimura M: Association between an HLA haplotype and low responsiveness to tetanus toxoid in man. *Nature* 272: 359 - 361 (1978)
158. Schellekens PTA, Vriesendorp B, Eijssvoogel VP, Leeuwen A von, Rood JJ van, Migdians V, Ceppellini R: Lymphocyte transformation in vitro. II Mixed lymphocyte culture in relation to leucocyte antigens. *Clin Exp Immunol* 6: 241 - 254 (1970)
159. Schulte-Wissermann H, Gardilicic S: Die Rolle des Thymus in der Entwicklung der Immunkompetenz. *Monatsschr Kinderheilk* 129: 378 - 390 (1981)
160. Schwick HG, Bräuer H: *Exempla immunologica*. Behringwerke Frankfurt (1980)
161. Sengar DPS, Mickey MR, Myhre BA, Chen HH, Terasaki PI: Mixed leucocyte culture response in HLA "identical individuals". *Transfusion* 11: 251 - 257 (1971)
162. Shackelford DA, Kaufmann JF, Korman AJ, Strominger DL: HLA-DR antigens: Structure, separation and subpopulations, gene cloning and function. *Immunol Rev* 66: 133 - 187 (1982)
163. Shearer GM, Mehmeon MI, Weinstein Y, Sela M: Regulation of antibody response by cells expressing histamine receptors. *J exp Med* 136: 1302 - 1307 (1972)
164. Shelley WB, Juhlin L: Langerhans cells form a reticuloepithelial trap for external contact antigen. *Natur* 261: 46 - 47 (1976)
165. Shou L, Schwartz SA, Good RA: Suppressor cell activity after concanavalin A treatment of lymphocytes from normal donors. *J exp Med* 143: 1100 - 1110 (1976)
166. Simpson E, Cantor H: Regulation of the immune response by subclasses of T lymphocytes. II The effect of adult thymectomy upon humoral and cellular responses in mice. *Eur J Immunol* 1: 337 - 343 (1975)
167. Skarnes AC, Watson DW: Antimicrobial factors of normal tissues and fluids. *Bacteriol Rev* 21: 273 - 294

168. Smith RT, Miescher PA, Good RA (eds.): Phylogeny of immunity. Univ of Florida Press (1966)
169. Snary D, Barnstable C, Bodmer WF, Goodfellow P, Crumpton MJ: Human Ia antigens - purification and molecular structure. Cold Spring Harbor Symp Quant Biol 41: 379 - 386 (1977)
170. Solbach W, Rölinghoff M, Wagner H: Die Rolle von Interleukin-2 bei der Aktivierung von zytotoxischen T-Lymphozyten. Klin Wschr 661: 67 - 75 (1983)
171. Sprent J: Migration and lifespan of lymphocytes. In: B and T cells in immune recognition (Loor F, Roelants GE eds.). John Wiley and Sons, Chichester: 59 - 82 (1977)
172. Stobo JD, Paul WE: Functional heterogeneity of murine lymphoid cells. III Differential responsiveness of T cells to Phytohemagglutinin and concanavalin A as a probe for T cell subsets. J Immunol 110: 362 - 375 (1973)
173. Strober S: Immune function, cell surface characteristics and maturation of B cell subpopulations. Transplant Rev 24: 84 - 112 (1975)
174. Taussig MJ, Lachmann PJ: Studies on antigenic competition. II Abolition of antigenic competition by antibody against or tolerance to the dominant antigen: a model for antigenic competition. Immunology 22: 185 - 197 (1972)
175. Temple A, Loewi G, Davies P, Howard A: Cytotoxicity of immune guinea-pig cell. II The mechanisms of macrophage cytotoxicity. Immunology 24: 655 - 699 (1973)
176. Terasaki PI, McClelland JD: Microdroplet assay of human serum cytotoxins. Natur 204: 998 - 1000 (1964)
177. Thoma RH, Taylor FB jr, Green GR: Delayed hypersensitivity to SK-SD: in vitro study with an active component. J Immunol 108: 231 - 235 (1972)
178. Thorbecke GJ, Benacerraf B: The reticulo-endothelial system and immunological phenomena. Prog Allergy 6: 559 - 598 (1962)

179. Treves AJ, Tal T, Barak V, Fuks Z: Antigen presentation and regulatory functions of human monocytes in the in vitro response of lymphocytes against purified protein derivative of tuberculin (PPD). *Eur J Immunol* 11: 487 - 492 (1981)
180. Türk W: Septische Erkrankungen bei Verkümmerng des Granulozytensystems. *Wien klin Wschr* 20: 157 - 162 (1907)
181. Valdimarsson H, Agnarsdottir G, Lachmann PJ: Measles virus receptor on human T-lymphocytes. *Nature* 255: 554 - 556 (1975)
182. Virchow R: Weisses Blut. Neue Notizen aus dem Gebiet der Natur- und Heilkunde, gesammelt von LF von Froriep und R Froriep 36: 151 - 162 (1845)
183. Virchow R: Weisses Blut und Milztumoren. *Med Ztg* 16: 3: 9 - 11 und 4: 15 - 18 (1847)
184. Virchow R: Weisses Blut (Leukämie). *Virchows Arch path Anat* 1: 563 - 583 (1847)
185. Vitetta ES, Uhr JW: IgD on murine lymphocytes: Implication for differentiation and stimulation of B lymphocytes. In: *Membrane Receptors of Lymphocytes* (Seligman M, Preud'homme JL, Kourilsky FM eds.). North Holland Publ, Amsterdam: 27 - 37 (1975)
186. Vossen JM, Hijmans W: Membrane associated immunoglobulin determinants on bone marrow and blood lymphocytes in the pediatric age group and on fetal tissues. *Ann N Y Acad Sci* 254: 262 - 279 (1975)
187. Waksman BH, Arnason B, Jankovic BD: Role of the thymus in immune reaction in rats. *J exp Med* 116: 187 - 227 (1962)
188. Waldman H, Munro A: T-cell dependent mediator in the immune response. *Nature* 243: 356 - 357 (1973)
189. Warner NL, Szenburg A, Burnet FM: The immunologic role of different lymphoid organs in the chicken. *Aust J exp Biol med Sci* 40: 373 - 388 (1962)

190. Watson J, Epstein R, Nakoinz I, Ralph P: The role of humoral factors in the initiation of the in vitro primary immune responses: effect of lymphocyte mitogens. *J Immunol* 110: 43 - 52 (1973)
191. Webb DR: Studies on the nonspecific regulation of immunocompetent cell function. In: *Immunopharmacology and the Regulation of Leukocyte Function* (Webb DR ed.). Marcel Dekker, New York, Volume 19: 143 - 158 (1982)
192. Wedgewood RG: Properdin. In: *Immunological methods* (Ackroyd JF von ed.). Blackwell Scientific Publications, Oxford: 25 - 42 (1964)
193. Wernet P: Human Ia-type alloantigens: methods of detection, aspects of chemistry and biology, markers for disease states. *Transplant Rev* 30: 76 - 104 (1970)
194. Wigzell H: Specific fractionation of immunocompetent cells. *Transplant Rev* 5: 76 - 104 (1970)
195. Williams M, Benacerraf B: Genetic control of thymus derived cell function. I In vitro DNA synthetic response of normal mouse spleen cells stimulated by the mitogens concanavalin A and phytohemagglutinin. *J exp Med* 135: 1279 - 1292 (1972)
196. Wolstencroft RA, Mathew M, Oates C, Maini RM, Dumondes DC: Lymphocyte mitogenic factor in cell mediated immunity. In: *The Role of Lymphocytes and Macrophages in the Immunological Response* (Dumonde DC ed.). Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York: 28 - 37 (1971)
197. Wood TA, Frenkel EP: The atypical Lymphocyte. *Am J Med* 42: 923 - 936 (1967)
198. Wood WB: Phagocytosis with particular reference to encapsulated bacteria. *Bacteriol Rev* 24: 41 - 49 (1960)
199. Yunis EJ, Amos DB: Three closely linked genetic systems relevant to transplantation. *Proc Nat Acad Sci USA* 68: 3031 - 3135 (1971)

200. Zaleski M, Milgrom F: Complementary genes controlling immune response to O -AKR antigen in mice. J Immunol 110: 1238 - 1244 (1973)
201. Zweimann B: In vitro effects of measles virus on proliferating human lymphocytes. J Immunol 106: 1154 - 1158 (1971)

7 Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. W. Mempel danke ich für die Überlassung des Themas und für die Möglichkeit, die Einrichtung des Transfusionszentrums der Medizinischen Klinik III, Klinikum Großhadern, zu benutzen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Reinhold Eckstein, Klinikum Charlottenburg, Berlin die Unterstützung bei der Planung und Auswertung der Experimente. Durch seine stets freundliche Diskussionsbereitschaft lieferte er mir wesentliche Denkanstöße, die entscheidend zur Erstellung des Gesamtkonzepts und zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. B. Schneider vom Institut für Biometrie der Medizinischen Hochschule Hannover danke ich für die hervorragende Beratung bei der Analyse der Versuchsdaten.

Mein Dank gilt auch Herrn Dipl. Ing. Fritz Pauker, Friedberg für die freundliche Überlassung seines Personal-Computers, der mir die Erstellung des Manuskriptes sehr erleichtert hat, und Herrn Dipl. Ing. Robert Lang, Utting für die Ausarbeitung eines Programms zur Erstellung der Grafiken.

Für die Unterstützung bei den medizinisch-technischen Untersuchungen danke ich allen Mitarbeiterinnen des Transfusionszentrums des Medizinischen Klinik III, Klinikum Großhadern, insbesondere Frau Angela Lehmeier.

8 Lebenslauf

Name: Marieluise Edlmann-Eingartner

Geburtsdatum: 10.7.1960

Geburtsort: Passau

Eltern: Ernst Edlmann,
Technisch Angestellter
Maria Edlmann, geb. Zirlinger,
Hausfrau

Schulausbildung: 1966-1971 Grundschule in Passau-Grubweg
1971-1980 Gisela-Gymnasium Passau-Niedernburg
1980 Abitur

Studium: 1980-1981 Universität des Saarlandes
1981-1985 Ludwig-Maximilians-Universität München
1985-1986 Praktisches Jahr

Ärztliche Prüfung: 1. Abschnitt: 1983
2. Abschnitt: 1985
3. Abschnitt: 1986

Approbation: 13.11.1986

